

MILTON VASCONCELOS GUEDES

**EFICIÊNCIA NA DETECÇÃO DOS VÍRUS PLRV, PVX E PVY
EM TECIDOS VEGETAIS DE GEMA APICAL DORMENTE
MAIS ESTOLÃO, BROTO E FOLHAS DA BATATA, PELO
MÉTODO SOROLÓGICO ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT
ASSAY-ELISA.**

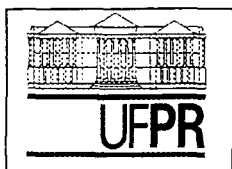
Dissertação de Mestrado apresentada para
obtenção do grau de Mestre em Produção
Vegetal, no Curso de Pós-Graduação em
Agronomia do Setor de Ciências Agrárias da
Universidade Federal do Paraná.

Orientadora:

Prof.^ª Dr.^ª Maria Lúcia R. Z. da Costa Lima.

CURITIBA

1999



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA E FITOSSANITARISMO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
PRODUÇÃO VEGETAL

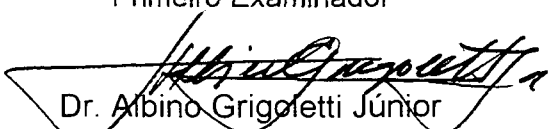
PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal, reuniram-se para realizar a arguição da Dissertação de MESTRADO, apresentada pelo candidato **MILTON VASCONCELOS GUEDES**, sob o título "**EFICIÊNCIA NA DETECÇÃO DOS VÍRUS PLRV, PVX E PVY EM TECIDOS VEGETAIS DE GEMA APICAL DORMENTE MAIS ESTOLÃO, BROTO E FOLHAS DA BATATA, PELO MÉTODO SOROLÓGICO ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY-ELISA**", para obtenção do grau de Mestre em Ciências do Curso de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.

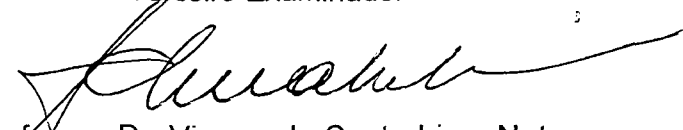
Após haver analisado o referido trabalho e arguido o candidato são de parecer pela "**APROVAÇÃO**" da Dissertação.

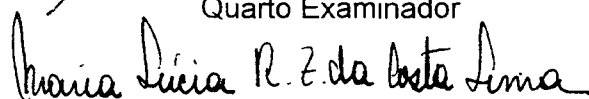
Curitiba, 30 de agosto de 1999.


Dr. Nilceu Ricetti Xavier de Nazareno
Primeiro Examinador


Dr. Albino Grigoletti Júnior
Segundo Examinador


Professor MSc. Henrique Soares Koehler
Terceiro Examinador


Professor Dr. Vismar da Costa Lima Neto
Quarto Examinador


Professora Dra. Maria Lúcia R. Z. da Costa Lima
Presidente da Banca e Orientadora

OFEREÇO

Obrigado, Senhor

Não é o Céu que tu me prometeste,
o que me leva, meu Deus, a Te Amar,
nem é o inferno, tão temido,
que evito de todas as formas Te ofender.

És Tu mesmo, Senhor, a quem eu quero.
Comove-me ver - Te pregado na Cruz e ofendido,
Comove-me o Teu corpo tão ferido,
Comovem-me as Tuas chagas e a Tua morte.

É o Teu amor que me comove, e de tal modo que,
Mesmo que não houvesse Céu, Te amaria, e,
Mesmo que não houvesse inferno, Te temeria.

Não tens que dar-me nada para que Te ame,
Pois mesmo que eu não esperasse o que espero,
do mesmo modo que Te amo Te amaria.

DEDICO

Ao meu Pai (In memorian) e minha mãe
que investiram na educação dos filhos.
Aos meus filhos, meu irmão e cunhada,
sobrinhos, amigos e familiares.

“O Senhor glorificou o pai nos filhos e
fortaleceu a autoridade da mãe sobre a
prole. Aquele que respeita o pai obtém o
perdão dos pecados. Aquele que
respeita o pai encontrará alegria nos
filhos e será atendido no dia da sua
oração. Aquele que honra o seu pai
viverá muito, e aquele que obedece ao
Senhor alegrará a sua mãe” .
Eclo 3, 2-6).

“Será que não brilha na tua alma o
desejo e que teu Pai-Deus fique
contente quando tiver que julgar-te?
(Beato Josemaría Escrivá).

“Quem são os retos de coração?
Aqueles que querem o que Deus quer.
Não queiras torcer a vontade de Deus
para acomodá-la á tua; corrige antes a
tua vontade para acomodá-la à vontade
de Deus” (Santo Agostinho).

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias, Curso de Pós-graduação em Agronomia, Engenharia Florestal, Solos, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Bioquímica do Centro Politécnico, e à Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento do Paraná pela oportunidade.

Agradeço o apoio de coordenadores, professores, colegas do curso de Pós-Graduação, bibliotecárias, funcionárias da Fitopatologia e da Universidade, aos amigos e colegas de trabalho da Secretaria de Estado da Agricultura e Abastecimento do Paraná (DEFIS, DERAL, CISM, REPOGRÁFIA, GRHS, Centro Diagnóstico Marcos Enrietti), e, demais colaboradores que serviram como exemplo de trabalho e dedicação e que muito nos incentivaram.

Agradeço em particular as(os) amigas(os) M. Sc. Regina Célia Zonta de Carvalho, M. Sc. Rosária R. T. B. Richartz, M. Sc. Sonia Maria Biesdorf, M. Sc. Renato Tratch, M. Sc. Lúcia Amélia Lazaro Lozano, Auxiliar de Laboratório Gilmar José Dias, Engº Agrº Roberto Tomaz, Engº Agrº Lincoln Eduardo de Camargo, Engº Agrº Edmundo E. Stammer, Med. Vet. Francisco Carvalho Madruga, Med. Vet. Mara Elisa Gasino Joineau, Dr. Antônio Carlos De Ávila, Dr. André N. Dusi, Dr. José A .C. de Souza Dias, Prof. Drª. Antonia dos Reis Figueira, M. Sc. Mário Nieweglowski Filho e Vera Lúcia Barbon.

Agradeço aos doadores da batata consumo Senhores Antônio Zesutko e Germaninho Krzyzanowski e dos fertilizantes pelo fabricante Solo Vivo Ind. e Com. de Fertilizantes Ltda., em Araucária-PR.

Agradeço aos amigos e professores Dr. Amir Pissaia, Dr. Edilberto Possamai, M. Sc. José C. Tosin e M. Sc. José L. C. Zambon.

Agradeço a amiga e professora orientadora Dra. Maria Lúcia R. Z. Costa Lima e aos meus co-orientadores Professores M. Sc. Henrique Soares Koehler, Dr. Nilceu R. X. de Nazareno e Dr. Vismar da Costa Lima Neto, pela amizade, paciência e orientação.

Agradeço a todos os amigos que espontaneamente nos ajudaram e incentivaram durante o Curso e foram muitos, pedindo desculpas aos que não constamos os nomes.

Muito obrigado a todos de coração.

EVANGELHO (Mt 18, 21-35)

Naquele tempo, Pedro aproximou-se de Jesus e perguntou:

“Senhor, quantas vezes devo perdoar, se meu irmão pecar contra mim? Até sete vezes?”

Jesus respondeu:

“Não te digo até sete vezes, mas até setenta vezes sete.”

SUMÁRIO

LISTAS DE TABELAS.....	viii
LISTAS DE GRÁFICOS.....	x
LISTAS DE APÊNDICES.....	xi
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. IMPORTÂNCIA DAS FITOVÍROSES EM BATATA NO BRASIL	5
2.1.1. Vírus do enrolamento da folha (PLRV)-Grupo Luteovírus.....	9
2.1.2. Vírus Y (PVY)-Grupo Potyvirus.....	11
2.1.3. Vírus X (PVX)-Grupo Potexvirus.....	12
2.2. DETECÇÃO DE VÍRUS PELA TÉCNICA SOROLÓGICA ELISA	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1. PROCEDIMENTO EXPERIMENTO	17
3.2. DELINEAMENTO ESTATÍSTICO E TRATAMENTOS EMPREGADOS.	17
3.3. PROCEDÊNCIAS DOS TUBÉRCULOS DE BATATA	18
3.3.1. Tubérculos controles infectados e sadios.....	18
3.3.2. Tubérculos das variedades	19
3.3.3. Descrição das variedades.....	20
3.4. PREPARO DO SOLO E PLANTIO	23
3.4.1. Preparo do solo.....	23
3.4.2. Plantio.....	24

3.4.2.1.	Plantio dos controles infectados por vírus e sadios.....	24
3.4.2.2.	Plantio dos tubérculos rebrotados das variedades de batata.....	24
3.5.	PROTOCOLO DAS-ELISA PARA DETECÇÃO DE PLRV, PVX E PVY.....	25
3.5.1.	1ª Etapa: Aderência dos Anticorpos Específicos dos vírus.....	25
3.5.2.	2ª Etapa: Aderência dos Antígenos.....	26
3.5.2.1.	Obtenção dos antígenos a partir de tecidos de gemas apical + estolão e distribuição nas microplacas.....	26
3.5.2.2.	Obtenção dos antígenos a partir de tecidos de brotos apical e lateral e distribuição nas microplacas.....	27
3.5.2.3.	Obtenção dos antígenos a partir de tecidos de folhas e distribuição nas microplacas.....	28
3.5.3.	3ª Etapa: adição dos conjugados enzimáticos específicos.....	29
3.5.4.	4ª Etapa: adição de fosfatase alcalina e leitura das reações.....	30
3.6.	INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS NAS MICROPLACAS POR LEITURA VISUAL E POR LEITORA DE ELISA.....	31
3.7.	CONSIDERAÇÕES SOBRE O USO DE LEITURA VISUAL E LEITORA DE ELISA.....	32
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
5.	CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES.....	57
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
7.	APÊNDICES.....	71

LISTA DE TABELAS

1	TRATAMENTOS RESULTANTES DO ARRANJO FATORIAL DE TRÊS ORIGENS DE MATERIAIS VEGETAIS (O) COM TRÊS VARIEDADES (V) DE BATATA.....	18
2	RESULTADOS DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA O PLRV, PVX e PVY NOS DIFERENTES TECIDOS VEGETAIS (GEMA APICAL + ESTOLÃO, BROTO E FOLHAS) NA BATATA <i>S. tuberosum</i> , VARIEDADES BARAKA, CONTENDA E ELVIRA, OBTIDOS NO TESTE DAS-ELISA POR MEIO DA LEITORA DE ELISA E LEITURA VISUAL.....	36
3	RESULTADOS DO TESTE DE TUKEY PARA A COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DOS TRATAMENTOS ESTUDADOS, COM OS RESPECTIVOS DESVIOS PADRÕES, DAS LEITURAS VISUAIS NEGATIVAS NA DETECÇÃO DE PLRV, PVX E PVY NA BATATA, VARIEDADE BARAKA.....	38
4	RESULTADOS DO TESTE DE TUKEY PARA A COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DOS TRATAMENTOS ESTUDADOS, COM OS RESPECTIVOS DESVIOS PADRÕES, DAS LEITURAS REALIZADAS PELA LEITORA DE ELISA NEGATIVAS NA DETECÇÃO DE PLRV, PVX E PVY NA BATATA, VARIEDADE BARAKA.....	39
5	RESULTADOS DO TESTE DE TUKEY PARA A COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DOS TRATAMENTOS ESTUDADOS, COM OS RESPECTIVOS DESVIOS PADRÕES DAS LEITURAS VISUAIS NEGATIVAS NA DETECÇÃO DE PLRV, PVX E PVY NA BATATA, VARIEDADE CONTENDA.....	40
6	RESULTADOS DO TESTE DE TUKEY PARA A COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DOS TRATAMENTOS ESTUDADOS, COM OS RESPECTIVOS DESVIOS PADRÕES DAS LEITURAS REALIZADAS PELA LEITORA DE ELISA NEGATIVAS NA DETECÇÃO DE PLRV, PVX E PVY NA BATATA, VARIEDADE CONTENDA.....	41

7	RESULTADOS DO TESTE DE TUKEY PARA A COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DOS TRATAMENTOS ESTUDADOS, COM OS RESPECTIVOS DESVIOS PADRÕES DAS LEITURAS VISUAIS NEGATIVAS NA DETECÇÃO DE PLRV, PVX E PVY NA BATATA, VARIEDADE ELVIRA.....	42
8	RESULTADOS DO TESTE DE TUKEY PARA A COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DOS TRATAMENTOS ESTUDADOS, COM OS RESPECTIVOS DESVIOS PADRÕES DAS LEITURAS REALIZADAS PELA LEITORA DE ELISA NEGATIVAS NA DETECÇÃO DE PLRV, PVX E PVY NA BATATA, VARIEDADE ELVIRA.....	43
9	ÍNDICES COMPARATIVOS OBTIDOS, EM PERCENTAGEM, PARA AS ORIGENS DE TECIDO VEGETAL GEMAS + ESTOLÃO, BROTO E FOLHAS PARA O PLRV, PVX E PVY NA BATATA, VARIEDADE BARAKA.....	44
10	ÍNDICES COMPARATIVOS OBTIDOS, EM PERCENTAGEM, PARA AS ORIGENS DE TECIDO VEGETAL GEMAS + ESTOLÃO, BROTO E FOLHAS PARA O PLRV, PVX E PVY NA BATATA, VARIEDADE CONTENDA.....	45
11	ÍNDICES COMPARATIVOS OBTIDOS, EM PERCENTAGEM, PARA AS ORIGENS DE TECIDO VEGETAL GEMAS + ESTOLÃO, BROTO E FOLHAS PARA O PLRV, PVX E PVY NA BATATA, VARIEDADE ELVIRA.....	46
12	COMPARATIVO DAS PERCENTAGENS MÉDIAS DE INCIDÊNCIA DE PLRV, PVX E PVY, PARA AS TRÊS VARIEDADES UTILIZADAS.....	51
13	SÍNTESE DOS RESULTADOS ESTATÍSTICOS DOS ÍNDICES DE REGULARIDADE E IGUALDADE NA AVALIAÇÃO DAS ORIGENS DE TECIDO VEGETAL DA VARIEDADE BARAKA A SEREM RECOMENDADAS PARA A DETECÇÃO DE VÍRUS.....	55
14	SÍNTESE DOS RESULTADOS ESTATÍSTICOS DOS ÍNDICES DE REGULARIDADE E IGUALDADE NA AVALIAÇÃO DAS ORIGENS DE TECIDO VEGETAL DA VARIEDADE CONTENDA A SEREM RECOMENDADAS PARA A DETECÇÃO DE VÍRUS.....	55
15	SÍNTESE DOS RESULTADOS ESTATÍSTICOS DOS ÍNDICES DE REGULARIDADE E IGUALDADE NA AVALIAÇÃO DAS ORIGENS DE TECIDO VEGETAL DA VARIEDADE ELVIRA A SEREM RECOMENDADAS PARA A DETECÇÃO DE VÍRUS.....	56

LISTA DE GRÁFICOS

1	ÍNDICES COMPARATIVOS DOS PERCENTUAIS DE IGUALDADE, ENTRE A LEITURA VISUAL E A LEITORA DE ELISA, DOS RESULTADOS DE VALORES NEGATIVOS OBTIDOS NO TESTE DAS-ELISA DAS CINCO REPETIÇÕES, PARA O PLRV, PVX E PVY, NAS PARTES VEGETAIS DA GEMA APICAL MAIS ESTOLÃO (G), BROTO (B) E FOLHAS (F), DA BATATA <i>S. tuberosum</i> , VARIEDADE BARAKA.....	48
2	ÍNDICES COMPARATIVOS DOS PERCENTUAIS DE IGUALDADE, ENTRE A LEITURA VISUAL E A LEITORA DE ELISA, DOS RESULTADOS DE VALORES NEGATIVOS OBTIDOS NO TESTE DAS-ELISA DAS CINCO REPETIÇÕES, PARA O PLRV, PVX e PVY, NAS PARTES VEGETAIS DA GEMA APICAL MAIS ESTOLÃO (G), BROTO (B) E FOLHAS (F), DA BATATA <i>S. tuberosum</i> , VARIEDADE CONTENDA.....	49
3	ÍNDICES COMPARATIVOS DOS PERCENTUAIS DE IGUALDADE, ENTRE A LEITURA VISUAL E A LEITORA DE ELISA, DOS RESULTADOS DE VALORES NEGATIVOS OBTIDOS NO TESTE DAS-ELISA DAS CINCO REPETIÇÕES, PARA O PLRV, PVX E PVY, NAS PARTES VEGETAIS DA GEMA APICAL MAIS ESTOLÃO (G), BROTO (B) E FOLHAS (F) DA BATATA <i>S. tuberosum</i> , VARIEDADE ELVIRA.....	50

LISTA DE APÊNDICES

1	MAPAPEAMENTO DE DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS NAS MICROPLACAS. SOROLOGIA. TESTE DAS ELISA. VARIEDADES : BARAKA, CONTENDA E ELVIRA. TECIDOS VEGETAIS : GEMA APICAL MAIS ESTOLÃO, BROTO E FOLHAS. PLACAS Nº : 01- B/C/E / VÍRUS PVX.....	72
2	MAPEAMENTO DE DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS NAS MICROPLACAS. SOROLOGIA. TESTE DAS ELISA. VARIEDADES : BARAKA, CONTENDA E ELVIRA. TECIDOS VEGETAIS: GEMA APICAL MAIS ESTOLÃO, BROTO E FOLHAS. PLACAS Nº 02 – B/C/E – VÍRUS PVY.....	73
3	MAPEAMENTO DE DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS NAS MICROPLACAS. SOROLOGIA. TESTE DE ELISA. VARIEDADES : BARAKA, CONTENDA E ELVIRA. TECIDOS VEGETAIS : GEMA APICAL MAIS ESTOLÃO, BROTO E FOLHAS. PLACAS Nº : 03 –B/C/E – VÍRUS PLRV.....	74
4	MAPEAMENTO DE DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS NAS MICROPLACAS. SOROLOGIA. TESTE DAS-ELISA. VARIEDADES : BARAKA, CONTENDA E ELVIRA. TECIDOS VEGETAIS : GEMA APICAL MAIS ESTOLÃO, BROTO E FOLHAS. PLACAS Nº 04 –B/C/E – VÍRUS PVX, PVY E PLRV.....	75
5	RESULTADOS DO NÚMERO DE VALORES NEGATIVOS E POSITIVOS OBTIDOS NO TESTE DAS-ELISA PELA LEITORA DE ELISA E LEITURA VISUAL, NAS DIFERENTES ORIGENS DE TECIDOS VEGETAIS, PARA A VARIEDADE BARAKA.....	76
6	RESULTADOS DO NÚMERO DE VALORES NEGATIVOS E POSITIVOS OBTIDOS NO TESTE DAS-ELISA PELA LEITORA DE ELISA E LEITURA VISUAL, NAS DIFERENTES ORIGENS DE TECIDOS VEGETAIS, PARA A VARIEDADE CONTENDA.....	76

7	RESULTADOS DO NÚMERO DE VALORES NEGATIVOS E POSITIVOS OBTIDOS NO TESTE DAS-ELISA PELA LEITORA DE ELISA E LEITURA VISUAL, NAS DIFERENTES ORIGENS DE TECIDOS VEGETAIS, PARA A VARIEDADE ELVIRA.....	77
8	COMPOSIÇÃO DOS TAMPÕES DAS QUATRO ETAPAS E LAVAGENS DAS MICROPLACAS NO TESTE DAS-ELISA.....	78

RESUMO

A propagação vegetativa da batata (*Solanum tuberosum* L.) é a causa da degenerescência de variedades uma vez que o tubérculo-semente utilizado no plantio pode perpetuar os vírus incidentes na planta-mãe. Daí a necessidade de renovação constante de estoques de batata-semente, bem como, de se obter técnicas eficientes de diagnóstico. Os objetivos gerais deste trabalho foram (1) comparar a eficiência na detecção dos vírus PLRV, PVX e PVY por meio do teste sorológico DAS-ELISA em tecidos vegetais de diferentes origens:- da gema apical + estolão, brotos e folhas, após quebra natural de dormência, das variedades Baraka, Contenda e Elvira; (2) verificar a confiabilidade da detecção de vírus em tecidos vegetais dormentes ou recém-brotados, visando reduzir o tempo de obtenção dos resultados em relação ao uso de folhas. Os objetivos específicos foram: avaliar a incidência dos diferentes vírus em amostras de campos de batata-consumo, na segunda geração de multiplicação; comparar os resultados obtidos com o equipamento de leitura de ELISA e os da leitura visual. A homogeneidade das variâncias dos tratamentos foi testada pelo teste de Bartlett e a comparação das médias dos tratamentos foi feita utilizando-se o teste de Tukey, ambos ao nível de 5% de probabilidade. Os resultados foram analisados utilizando-se o programa estatístico MSTATC, versão 2.11. A incidência média das diferentes viroses nas amostras das variedades Baraka, Contenda e Elvira, foi maior para PVY e PLRV, e muito baixa para PVX. O PVY foi o vírus de maior incidência nas três variedades: 14,1% em Baraka, 10,9% em Elvira e 2,9% em Contenda. O PLRV ocorreu com incidência de 3,6% na variedade Elvira, 2,3% em Baraka e 0,7% em Contenda. O PVX foi detectado em níveis inferiores a 0,5% nas três variedades; a variedade Contenda foi a que apresentou os menores índices médios de incidência para os três vírus, quando comparados às demais variedades estudadas; o teste DAS-ELISA pode ser utilizado na detecção dos vírus PLRV e PVX, tanto em gema apical dormente + estolão, como em brotos ou folhas, após quebra natural de dormência nas variedades Baraka, Contenda e Elvira; a eficiência do teste DAS ELISA pode variar de acordo com a origem do tecido vegetal utilizado; o vírus PVY, não pode ser detectado com segurança na gema apical dormente + estolão, para as três variedades testadas. Tendo em vista os resultados apresentados pode-se concluir que a detecção das viroses em brotos foi mais eficiente para todas as variedades estudadas antecipando-se os resultados e proporcionando um ganho de no mínimo 30 dias.

ABSTRACT

The vegetative propagation in potatoes (*Solanum tuberosum* L.) is the cause of varietal degenerescence, once seed tubers from infected mother plants may carry viruses. Therefore, there is a need for constant seedstock renewal, as well as reliable diagnostic techniques. The general objectives of this work were (1) compare the detection efficiency for PLRV, PVY, and PVX under the DAS-ELISA serological test in plant tissues of different origins, tuber end + stolon end, sprouts and leaves, after natural break of dormancy from 'Baraka', 'Contenda', and 'Elvira'; (2) verify the reliance of virus detection in dormant, or early sprouting tissues in relation to leaves, as a matter of time saving to obtain results. Specific objectives were: assess the different viruses incidences in second generation tubers from ware potato fields; compare results from electronic and visual readings in DAS-ELISA tests. Homoscedasticity was tested using the Bartlett test, and mean treatment comparison was done using the Tuckey test, both at 5% probability level. Results were analysed using MSTATC statistical program, version 2.11. The mean incidence of PVY and PLRV in 'Baraka', 'Contenda', and 'Elvira' was greater than the mean incidence of PVX. PVY had the highest incidence in all three cultivars: 14.1%; 10.9, and 2.9 for 'Baraka', 'Elvira', and 'Contenda', respectively. PLRV incidences were, 3.6%, 2.3%, and 0.7% for 'Elvira', 'Baraka', and 'Contenda', respectively. PVX was detected with levels below 0.5% for all 3 cultivars. 'Contenda' presented the lowest incidence for all viruses, as compared to the other cultivars studied. DAS-ELISA could be used to detect PLRV and PVX either in dormant tuber end + stolon end, or in sprouts, or in leaves, after natural break of dormancy, of 'Baraka', 'Contenda', and 'Elvira'; the reliance on DAS-ELISA results may change depending on the sample source used; PVY could not be safely detected from tuber end + stolon end samples, for the three studied cultivars. In conclusion, based on the obtained results, it can be said that: detection of viruses in sprouts was more efficient and reliable for all the studied cultivars, representing a 30 day gain in time to obtain the results.

1. INTRODUÇÃO

A batata *Solanum tuberosum* L. da família *Solanaceae* é o quarto produto de cultivo alimentício em ordem de importância a nível mundial, depois do trigo, arroz e o milho. A produção anual de batata representa aproximadamente a metade da produção mundial de todos os tubérculos e raízes. Desde os princípios da década de sessenta, o incremento percentual da área cultivada nos países em desenvolvimento tem sido maior nesta solanácea do que para qualquer outro cultivo alimentício (LA PAPA EM CIFRAS, 1995).

Atualmente, a produção mundial soma 275 milhões de toneladas utilizando 18 milhões de hectares sendo a Federação Russa o primeiro produtor mundial de batata seguida pela China. A Rússia, juntamente com a Polônia, concentram aproximadamente 28% do total da área cultivada no mundo. Na atualidade, o setor dedicado ao cultivo de batata no mundo está em transição. A maior parte da produção tem sido da Europa e da Ex-União Soviética, porém, esta situação está mudando rapidamente pois os países em desenvolvimento cuja participação no início da década de sessenta era de 11% na produção mundial, no início desta década passou a ser de 30%. Ao manter essa tendência, em menos de uma geração, a maior parte da produção de batata no mundo poderá ser colhida na Ásia, África e América Latina (LA

PAPA EM CIFRAS, 1995).

No Brasil, a batata é uma das olerícolas cultivadas de maior importância, com uma área plantada de 159.421 ha, produção de 2.313.915 t. e produtividade de 14.514 kg/ha na safra de 1997/98 (SEAB/DERAL, 1998).

A nível mundial o Brasil é o 21º produtor de batata sendo nossa produtividade média cerca de 2,7 vezes menor do que a dos principais países produtores como a Holanda, Alemanha, EUA e França. Na mesma comparação feita com países da América do Sul, em 1993, a produtividade brasileira (14.609 kg/ha), foi inferior à da Colômbia (15.454 kg/ha) e Argentina (16.667 kg/ha) e superior à do Peru (8.291 kg/ha) (MORIMOTO, 1996).

No Estado do Paraná, na safra de 1996, a cultura teve área plantada de 49.382 ha, com produção de 726.283 t. e rendimento de 14.707kg/ha. O Paraná ocupa o 2º lugar na produção brasileira e 3º lugar em produtividade perdendo para Minas Gerais (22.283 kg/ha) e São Paulo (19.133 kg/ha) (FUNDAÇÃO IBGE, 1997).

Desde que a batata começou a ser cultivada no Brasil, o fenômeno da degenerescência das sementes, após plantios sucessivos, tem sido motivo de preocupação e estudo. A principal causa da perda de sanidade tem sido a ocorrência de doenças viróticas perpetuadas para as gerações subsequentes através dos tubérculos-semente, diminuindo significativamente a produção e produtividade (PUTTEMANS, 1934; SILBERSCHIMIDT, 1937; COSTA e KRUG, 1937; COSTA, 1948; CUPERTINO e COSTA, 1968; 1970; CUPERTINO **et al.**, 1972; CUPERTINO, 1972; DANIELS, 1983, 1995; MALLOZZI, 1986; SOUZA-DIAS **et al.**, 1990, 1993).

Em programas nacionais de produção de semente, o controle da sanidade dos tubérculos-semente produzidos e/ou a avaliação da sanidade das plantas no decorrer

do ciclo da cultura tem sido baseado em: (a) inspeções visuais (b) testes biológicos como a transmissão mecânica em plantas indicadoras, transmissão por união de tecidos e por vetores, além das avaliações por pré-cultura (c) testes sorológicos entre eles o ELISA e DAS-ELISA.

Apesar dos testes sorológicos estarem sendo empregados nos programas de certificação de batata-semente (DUSI **et al.**, 1991, SOUZA DIAS e COSTA, 1992; SOUZA DIAS **et al.**, 1992, 1995a) sua utilização em larga escala é limitada pela indisponibilidade dos antisoros em grande quantidade. Testes como o DOT-BLOT e PCR (Polymerase Chain Reaction), embora utilizados na detecção de vírus em batata em nosso país tem seu uso ainda restrito (BRIOSO **et al.**, 1993; VEGA **et al.**, 1992).

O método ELISA e DAS-ELISA tem sido usado rotineiramente pelo laboratório de Virologia Vegetal, do Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti, da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Paraná, para avaliação da sanidade de lotes de batata-semente nacionais e importados. A literatura pertinente é variada em relação às origens de tecidos vegetais a serem utilizadas no teste tais como: gemas, brotos e folhas, na obtenção de antígenos. Todavia, existem controvérsias entre pesquisadores nacionais sobre qual a origem de tecido vegetal mais confiável para detecção dos vírus incidentes em batata.

Neste trabalho, partiu-se da hipótese que a utilização de tecidos vegetais de idades fisiológicas diferentes tais como: gema apical + estolão de tubérculo dormente, brotos e folhas podem apresentar diferentes concentrações e distribuições de vírus, e, conseqüentemente, não se poderia usar indiscriminadamente quaisquer desses tecidos na detecção de vírus.

Os objetivos gerais foram (1) comparar a eficiência na detecção dos vírus PVX,

PVY e PLRV por meio do teste sorológico DAS-ELISA (tipo sanduíche de duplo anticorpo) quando da utilização das origens de tecidos vegetais: gema apical + estolão, brotos e folhas, procedentes de três variedades de batata Baraka, Contenda e Elvira (2) verificar a eficiência da detecção de vírus em tecidos vegetais dormentes ou recém-brotados, visando reduzir o tempo de obtenção dos resultados em relação ao uso de folhas.

Os objetivos específicos foram: avaliar a incidência dos diferentes vírus nas amostras, oriundas de campos de batata-consumo, na segunda geração de multiplicação; comparar a eficiência da interpretação dos resultados obtidos nas microplacas usando o equipamento de leitura de ELISA com os da leitura visual.

Recentemente, com as ações de integração e desenvolvimento fronteiriço com os demais países do MERCOSUL a importação de batata-semente básica demonstra uma tendência de aumento, principalmente a proveniente da Argentina e do Chile. Neste contexto, torna-se importante para o Brasil, dispor de metodologia que permita a utilização de testes de diagnose de vírus especialmente as que possam utilizar tecidos de origem de material vegetal de tubérculos dormentes ou recém-brotados o que agilizará a emissão de laudos fitossanitários.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. IMPORTÂNCIA DAS FITOVIROSES EM BATATA NO BRASIL.

A cultura da batata é afetada por cerca de 42 vírus diferentes, relatados em várias localidades brasileiras nas regiões bataticultoras (BRIOSO **et al.** 1996) porém os mais freqüentemente encontrados tem sido o enrolamento da folha- PLRV, o vírus Y- PVY e em menor escala os vírus X- PVX, vírus S- PVS, vírus M-PVM, e o Andean Potato Mottle Virus - APMV (COSTA e KRUG, 1937; COSTA, 1948; 1965; PUTTEMANS, 1934; SILBERSCHMIDT, 1937, 1949; ELIAS, 1955; SILBERSCHMIDT e MALLOZZI, 1961; SILBERSCHMIDT **et al.** 1941; CUPERTINO e COSTA, 1968; SIQUEIRA, 1976; SOUZA DIAS **et al.**, 1983; MALLOZZI 1984; LIMA e HAMERSCHMIDT, 1982; DANIELS 1983, 1995; BRIOSO **et al.** 1995; CUPERTINO, 1970; CUPERTINO **et al.**, 1972; CUPERTINO **et al.**, 1973; ÁVILA **et al.**, 1984, ÁVILA e BEEK, 1987; SOUZA DIAS **et al.** 1979, 1982, 1990, 1993; SOUZA DIAS, 1995).

Em levantamentos efetuados em São Paulo e Minas Gerais, incidências de quase 100% foram verificadas em materiais importados livres de vírus após algumas multiplicações em campo (SOUZA DIAS **et al.**, 1990; ANDRADE, 1989). Há registros

de plantios feitos com batata-semente praticamente livre de vírus (batata “de caixa” ou “registrada”) que ao final de um ou dois ciclos apresentaram índices superiores a 40% de PLRV nos tubérculos produzidos (SOUZA DIAS, 1995). Lotes de batata-semente “consumo” originárias de campos de semente básica importada ou registrada nacional, com mais de 4 multiplicações da semente básica ou registrada nacional apresentaram de 5 a mais de 70 % de infecção secundária por PLRV (SOUZA DIAS, 1995). No Paraná, LIMA e HAMERSCHMIDT (1982), verificaram que 83.2% dos tubérculos utilizados para plantio de batata consumo, nos municípios de Contenda e Araúcaria estavam infectados por vírus, sendo o PLRV responsável por 75.3% das infecções.

A incidência do vírus Y vem aumentando, nos últimos anos, no País em função da entrada de material contaminado. Segundo FIGUEIRA e PINTO (1995), na variedade Achat importada da Alemanha, foi detectado o PVY em índices relativamente altos embora dentro dos limites exigidos pelo Brasil, resultando em campos tanto no Estado de São Paulo como em Minas Gerais, com incidências preocupantes dessa virose, devido a alta capacidade de disseminação deste vírus. Situação similar aconteceu com a cultivar Atlantic importada do Canadá, que embora com teores do vírus dentro dos padrões de tolerância brasileiros, redundaram em campos com incidências que variaram de 7 a 16%, no estado do Paraná (SOUZA DIAS **et al.**, 1995).

O vírus X tem sido detectado esporadicamente (SILBERSCHMIDT **et al.** 1941; COSTA, 1965) sendo que a interação X + Y induz geralmente uma sintomatologia mais severa, tendo sido observada esta situação esporadicamente (SILBERSCHMIDT e MALLOZZI, 1961, COSTA, 1965; SOUZA DIAS **et al.**, 1995b).

No Paraná, a partir de 1992, a Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento, passou a utilizar o método sorológico DAS-ELISA para a detecção dos vírus PVX, PVY e PLRV. Em exame realizado em 32 lotes, de 200 tubérculos cada, o vírus X foi o de menor ocorrência, presente em apenas 2 lotes com percentuais de 2,0 e 4,4%. O PVY estava presente em 22 dos 32 lotes examinados, em porcentagens que variaram de 0,5 à 14,5% e o vírus do enrolamento da folha (PLRV) ocorreu em 18 das 32 amostras em porcentagens que variaram de 0,5 à 24,5% (LIMA, 1995).

A bataticultura gaúcha tem características únicas em relação à praticada em outros estados, pois baseia-se, quase que exclusivamente, em cultivares nacionais, destacando-se a Baronesa, com mais de 80% da área plantada, e, mais recentemente, a Monte Bonito vem ocupando lugar de destaque. Levantamentos de incidência de viroses, mostraram que a infecção por PLRV na cultivar Baronesa, promoveu uma redução da produtividade da ordem de 50%. Esta informação, juntamente com os dados da incidência nas lavouras, permitiram estimar as perdas ocasionadas por PLRV no Rio Grande do Sul em 20% da produção ou seja, aproximadamente, 60.000 t/ano (DANIELS, 1982, 1995).

Os principais fatores que influenciam o aumento progressivo das viroses após as sucessivas multiplicações dos tubérculos-semente são: o elevado potencial de inóculo representado por plantas hospedeiras infectadas, cultivadas ou da vegetação espontânea; a presença de população de vetores praticamente durante todo o ano e a dificuldade de reconhecimento dos sintomas causados pelos vírus sob condições de campo (CUPERTINO e COSTA, 1968). A degenerescência pode, ainda, ser acelerada pelo acúmulo de mais de um vírus na planta-mãe com conseqüente variabilidade de

sintomatologia dificultando a diagnose e perpetuando-os para os tubérculos-filhos (MALLOZZI, 1986).

Por esse motivo, desde o início das tentativas de produção de batata-semente de alta qualidade fitossanitária no País, uma das maiores dificuldades dos técnicos responsáveis pela fiscalização dos campos tem sido a diagnose visual de moléstias viróticas, pois somados à dificuldade de reconhecimento outros fatores tais como alta temperatura e luminosidade, infecções latentes, idade da planta, cultivar, causas nutricionais e não parasitárias, podem mascarar os sintomas provocados pelos vírus nas plantas (CUPERTINO e COSTA, 1967; VEGA **et al.**, 1990; SALAZAR, 1995).

Para melhorar a qualidade sanitária da semente multiplicada no Brasil, possibilitando não só um maior número de multiplicações do material importado mas também um aumento na produtividade, estabeleceram-se normas de produção e certificação de batata-semente fiscalizadas pelo Ministério da Agricultura -MARA ou delegando, por meio de convênios com várias Instituições governamentais entre elas as Secretarias Estaduais de Agricultura das regiões produtoras, caso do estado do Paraná em que o controle pós-colheita da batata-semente é obrigatório e regulamentado (SIQUEIRA, 1968; PARANÁ 1981; REGINA, 1982).

A pré-cultura ou pré plantio dos tubérculos para observação dos sintomas nas plantas tem sido um método bastante empregado, principalmente pelos sistemas de certificação de batata-semente do Estado de São Paulo para avaliação da sanidade em pós-colheita (MALLOZZI, 1974; 1976). Os testes biológicos de transmissão mecânica, transmissão por união de tecidos e por vetores, apesar de eficientes, são demorados além de envolver infra-estrutura necessária à manutenção de plantas e vetores (CUPERTINO e COSTA, 1967; 1968; BETTI, 1995).

Essas limitações relacionadas com as técnicas de diagnose do PLRV, começaram a ser minimizadas quando surgiu a técnica serológica ELISA.

Apesar dos esforços no sentido de tornar o País menos dependente da importação de batata-semente anualmente são gastos 12 milhões de dólares com a importação de batata-semente básica, que é insuficiente para a demanda dos campos de certificação do País (Maria Mazarelo, Informação Pessoal).

No Estado do Paraná, a demanda potencial estimada de tubérculos-semente, safra 97/98, foi de 74.030 t.. Entretanto, a demanda efetiva foi em torno de 30% deste total, estimando-se um déficit de 52.820 t, ou seja, 1.760.666 caixas de 30kg (SEAB/DEFIS-DPSM, 1999).

2.1.1. VÍRUS DO ENROLAMENTO DA FOLHA (PLRV) - GRUPO LUTEOVIRUS.

Tanto no Brasil como em outros países, onde a batata é cultivada, o vírus do enrolamento da folha (Potato Leafroll Virus - PLRV), tem sido considerado o fitovírus mais importante, responsável pela maioria das perdas causadas nessa cultura (SCHULTZ e FOLSON, 1921; 1923; COSTA, A. S., 1965; CUPERTINO **et al.**, 1972; HOWELL, 1973; Mc DONALD, 1976, SIQUEIRA, 1976; MARCO, 1981; LIMA e HAMERSCHIMIDT, 1982; MALLOZZI, 1982 ; SOUZA DIAS **et al.** 1984a; 1984b; 1990; PETERS, 1987, BEEMSTER e DE BOKX, 1987).

São dois os quadros sintomatológicos em plantas infectadas com o PLRV. Os sintomas provenientes de tubérculos infectados no plantio anterior, chamados de sintomas secundários e os de infecção na estação corrente, chamados sintomas primários (CUPERTINO e COSTA, 1968). Os sintomas primários se caracterizam

principalmente por um enrolamento apical e descoloração na base dos folíolos superiores que se tornam quebradiços, enquanto que as folhas mais velhas e as plantas infectadas no final do ciclo podem ter aparência sadia (SCHULTZ e FOLSON, 1921; CUPERTINO e COSTA, 1968; SOUZA DIAS *et al.*, 1983).

Embora esses sintomas primários descritos sejam os mais comuns, plantas severamente infectadas, principalmente as que são inoculadas no início do ciclo, podem apresentar alterações semelhantes às observadas nos sintomas secundários, em que o enrolamento ocorre principalmente nas folhas inferiores. Além disso, as folhas formam um ângulo menor em relação a parte superior e as plantas ficam enfezadas, com internódios curtos e maior ramificação, produzem tubérculos pequenos e escassos e apresentam, em alguns casos, clorose e arroxamento das bordas dos folíolos e necrose dos vasos próximos ao estolão (COSTA, A. S., 1965; TOKESHI e BERGAMIN, 1980; SOUZA DIAS *et al.*, 1985).

Os sintomas secundários e os sintomas primários provenientes de infecção na fase inicial do ciclo da cultura são mais facilmente identificáveis. Entretanto, é muito difícil reconhecê-los, em infecções tardias, e quase impossível notar qualquer alteração em infecções de final de ciclo (CUPERTINO e COSTA, 1968).

A transmissão do PLRV é por meio de afídeos vetores dentre os quais se destaca o *Myzus persicae* (YUKI, 1982; DE BOKX, 1987; PETERS, 1987; HOLBROOK, 1978). Estes vetores são comuns no Brasil durante todo o ano, e a existência de fonte de inóculo abundante representada por plantas cultivadas e da vegetação espontânea possibilita alta taxa de disseminação durante todo o ciclo da cultura (COSTA, 1970).

2.1.2. VÍRUS Y (PVY) - GRUPO POTYVIRUS.

O vírus do mosaico Y, Potato Vírus Y (PVY), também como o PLRV é considerado importante induzindo sintomas bastante variados nas plantas pois, além da existência de diferentes estirpes, as reações dependem da variedade. Os sintomas variam desde um mosqueado ou mosaico leve até uma necrose pronunciada e morte de folíolos (SILBERSCHIMIDT e KRAMER, 1942; DE BOKX **et al.**, 1977, TOKESHI e BERGAMIN, 1980).

A transmissão do PVY, semelhantemente ao PLRV é por meio de afídeos vetores dentre os quais se destaca o *Myzus persicae* (YUKI, 1982; DE BOKX, 1987; PETERS, 1987; HOLBROOK, 1978). A população dos afídios se mantém no Brasil praticamente durante todo o ano e, aliada às fontes de inóculo representadas por plantas cultivadas e da vegetação espontânea garantem a possibilidade de disseminação durante todo o ciclo da cultura (COSTA, 1970).

Trabalhos recentes mostram um aumento na incidência dessa virose nas áreas de produção de batata, fato esse associado à perpetuação do vírus na batata-semente. Assim, foi observada nova raça do PVY^N na batata-semente da variedade Bintje importada da Argentina sendo, praticamente, insignificante a presença do PLRV (SOUZA DIAS, **et al.**, 1992). Mais recentemente, 7 a 16% de tubérculos-semente da variedade Atlantic, importada do Canadá, estavam infectados pelo PVY (SOUZA DIAS **et al.**, 1995). O fato merece atenção pois na América do Norte, no início da década ocorreu surto de uma raça de PVY o PVY^{NN} (MC DONALD e SINGH, 1993).

Em Minas Gerais, com a finalidade de determinar qual era a estirpe do PVY prevalente na região Sul do estado, foi realizada amostragem, no período de 1983 a

1985, de tubérculos provenientes de plantas infectadas com PVY, coletados nas diversas regiões produtoras de batata-semente e consumo. Os resultados obtidos mostraram que a estirpe predominante era a comum (PVY^O), apresentando uma incidência de 91,6%, seguida pelas estirpes necróticas PVY^N com incidência de 6,2% e PVY^C com 2,2 % (ANDRADE e FIGUEIRA, 1992).

2.1.3. VIRUS X (PVX) - GRUPO POTEXVIRUS.

O PVX, na maioria das vezes, pode ficar latente na planta sem induzir nenhum sintoma ou apresentar um mosaico leve. Entretanto, se associado a outro vírus como o PVY, pode induzir um efeito sinérgico redundando numa intensificação dos sintomas (DE BOKX, 1987).

A disseminação do PVX na cultura é principalmente mecânica portanto com mecanismo menos eficiente de disseminação que o PVY e PLRV onde os afídios vetores tem um papel importante. A incidência deste vírus tem sido rara e esporádica em nossos batatais (SILBERSCHMIDT e MALLOZZI, 1961; COSTA, 1965; SOUZA DIAS *et al.*, 1995).

2.2. DETECÇÃO DE VÍRUS PELA TÉCNICA SOROLÓGICA ELISA

Pesquisadores brasileiros vem trabalhando, desde 1938, no sentido de avaliar testes disponíveis que pudessem ser utilizados em larga escala no controle da qualidade fitossanitária dos tubérculos nos programas de certificação de batata. Métodos sorológicos, técnicas moleculares e associação destas com microscopia

eletrônica vem sendo avaliadas em nossas condições desde o final da década de 80 e, principalmente, na de 90, no monitoramento de vírus em batata tais como: Testes de aglutinação com Látex, Difusão Dupla em Gel de Agar, ELISA-Enzyme Linked Imunosorbent Assay, MEIAD-Microscopic Electronic Imunosorbent Assay Decoration, Microprecipitina Tissue Print, PCR - Polymerase Chain Reaction e Dot-Blot (COSTA e KIEHL, 1938; COSTA **et al.**, 1964, ÁVILA e BEEK, 1987; DUSI e ÁVILA, 1988; FONSECA **et al.**, 1994; GASPAR **et al.**, 1994; PIO-RIBEIRO **et al.**, 1994; SOUZA DIAS **et al.**, 1994, 1995; RESENDE, 1995; BRIOSO **et al.**, 1994, 1996; EIRAS **et al.**, 1998).

A técnica de ELISA foi desenvolvida no final da década de 80 e o seu potencial para detecção e quantificação de fitopatógenos foi investigada e adaptada para a cultura da batata na "East Mailing Research Station" (VOLLER **et al.**, 1976). Desde então, foram amplamente exploradas as possibilidades de emprego dessa técnica para diagnose de vírus em batata em vários países produtores, inclusive o Brasil (CLARK **et al.** 1976; CASPER, 1977; MAAT e DE BOKX, 1978; GUGERLI, 1979; ROBERTS e HARRISON, 1979; DE BOKX e MAAT, 1979; TAKANAMI e KUBO, 1979; SALAZAR, 1979; CLARKE **et al.**, 1980; DE BOKX **et al.** 1980, 1982a, 1982b, SING e Mc DONALD, 1981; SINGH, 1983; DUSI e ÁVILA, 1988; PIO-RIBEIRO **et al.** 1994; SOUZA DIAS, 1995.

O ELISA e técnicas derivadas como DAS-ELISA (ELISA tipo sanduíche de duplo anticorpo); o NCM-ELISA (utilizando membranas de Nitrocelulose) tem permitido detectar e identificar quantidades mínimas de vírus e viroides, em um número grande de amostras, a curto prazo (SALAZAR, 1995). Essas técnicas, derivadas do ELISA, tem como característica maximizar a sensibilidade do teste e reduzir a

inespecificidade das reações (VAN VUURDE e MAAT, 1985; SELF, 1985; FLEG e CLARK, 1979; HEUVEL e PETERS, 1989).

A análise da qualidade fitossanitária em tubérculos-dormentes por ELISA tem sido utilizada em vários programas de certificação de batata em países produtores, inclusive o Brasil. No entanto, alguns autores tem contestado a sua confiabilidade quando valores altos de absorbância foram observados em extratos de tubérculos sadios (CLARKE; CONVERSE e KOJIMA, 1980; TAMADA e HARRISON, 1980; BACKER, 1987). O ELISA tem sido usado para detecção de vírus em tubérculos brotados (VETTEN *et al.*, 1983) e também em folhas (TAMATA e HARRISON, 1980; BACKER, 1987).

Esta técnica imunológica (ELISA) tem sido bastante utilizada na detecção de vírus em batata por apresentar sensibilidade para a maioria dos vírus, incluindo-se os que podem apresentar baixa concentração nas plantas e tubérculos infectados por requerer quantidades menores de antisoro que outros métodos sorológicos e por fornecer resultados rápidos e confiáveis (SALAZAR, 1993, 1995).

Pesquisadores brasileiros que atuam no monitoramento de vírus em tubérculos-semente vem utilizando diferentes origens de tecidos vegetais tais como gemas, brotos e folhas para obtenção dos antígenos para realização do ELISA. Tentativas de se obter plantas para realização do teste a partir de gemas destacadas não foram bem sucedidas por ocorrer um alto percentual de apodrecimento das mesmas, em diversos substratos testados (INOUE e FIGUEIRA, 1989; INOUE *et al.*, 1989). Tendo em vista resultados anteriormente obtidos, FIGUEIRA *et al.* (1988), passaram a utilizar brotos de tubérculos após a quebra de dormência para a detecção do PLRV, porém foram observados “escapes” o que comprometeu o resultado final

destes testes.

Para detecção do PLRV por ELISA foi empregado tecido de gema sendo os resultados obtidos considerados confiáveis pelos autores SOUZA DIAS, **et al.** (1995).

No trabalho de SPIELG e MARTIN (1993), o método ELISA foi comparado com o PCR na detecção de PLRV em tubérculos dormentes provenientes de campo e também em minitubérculos dormentes originários de cultivo "in vitro", sendo que o ELISA só foi eficiente na detecção do vírus nos minitubérculos.

Segundo VETTEN **et al.** (1983), o ELISA realizado a partir de tubérculos dormentes para detectar o PVY e PVA, em função da baixa concentração desses vírus no tecido aliada a uma distribuição irregular, poderia levar a escapes que comprometeriam sua eficiência. O uso de rindite para quebra de dormência dos tubérculos permitiu aumentar a eficiência na detecção de PVY e PVA em comparação com tubérculos sem quebra de dormência. Segundo os autores, a quebra de dormência teria estimulado a multiplicação dos vírus nos tubérculos sendo que 4 a 6 semanas, após o tratamento com rindite, foi observado o pico máximo de multiplicação dos vírus, porém a resistência da variedade influenciava esta multiplicação viral.

Os vírus e outros agentes sistêmicos se localizam no anel vascular e nas gemas dos tubérculos de batata. Quando ocorre a brotação das gemas, há um estímulo para multiplicação viral e uma distribuição mais homogênea no anel vascular. Entretanto, segundo SALAZAR (1993,1995), às vezes, há dificuldade de translocação dos vírus ou mesmo baixa concentração no tecido vascular o que pode possibilitar o aparecimento de brotos livres de vírus.

Nos testes de rotina de detecção de vírus no Laboratório de Virologia do

Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti, o teste ELISA tem sido realizado em amostras de folhas de planta de batata. A brotação de tubérculos, após a quebra de dormência, leva em média 30 dias; do plantio à coleta de folhas o tempo é de 60 dias, totalizando um período de cerca de 90 dias para concluir todas as operações. Outro fator a ser considerado é a disponibilidade de infra-estrutura para o plantio e desenvolvimento adequado das plantas doadoras de folhas. Este período, é considerado relativamente longo para a emissão dos laudos. O produtor nem sempre tem condições de armazenar adequadamente os tubérculos produzidos, daí a premência na emissão dos laudos para que possa comercializa-los o mais rápido possível (GUEDES, dados não publicados).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Os experimentos foram conduzidos em laboratório, telado e casa de vegetação do “Centro Diagnóstico Marcos Enrietti”, situado no campus do Setor de Ciências Agrárias -UFPR, no período de setembro de 1998 a fevereiro de 1999.

Foram utilizadas as variedades de batata Baraka, Contenda e Elvira de cujos tubérculos em diferentes idades fisiológicas foram retiradas gemas apical e estolão e brotos para obtenção de suco (antígeno) a ser utilizado no teste DAS-ELISA para detecção dos vírus PLRV, PVX e PVY. Neste trabalho para facilidade de redação denominamos de estolão a região cicatricial no tubérculo onde o estolão originalmente o ligava à planta-mãe. Para obtenção do antígeno a partir de folhas, os tubérculos foram plantados para desenvolvimento das plantas doadoras.

3.2. DELINEAMENTO ESTATÍSTICO E TRATAMENTOS EMPREGADOS.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com 9 tratamentos e 5 repetições. Os tratamentos representam o arranjo fatorial de três

origens de tecidos vegetais amostrados com três variedades de batata conforme descrito na Tabela 01.

As unidades experimentais foram constituídas por 20 tubérculos de batata, sendo que os dados analisados correspondem à média obtida para cada unidade experimental.

A homogeneidade das variâncias dos tratamentos foi testada pelo teste de BARTLETT e a comparação das médias dos tratamentos foi feita utilizando-se o teste de TUKEY, ambos ao nível de 5% de probabilidade. Os resultados foram analisados utilizando-se o programa estatístico MSTATC, versão 2.11.

TABELA 01 - TRATAMENTOS RESULTANTES DO ARRANJO FATORIAL DE TRÊS ORIGENS DE TECIDOS VEGETAIS (O) COM TRÊS VARIEDADES DE BATATAS (V).

TRATAMENTOS	VARIEDADES DE BATATA	ORIGEM DOS TECIDOS VEGETAIS
V_1O_1	Baraka	Gema + Estolão
V_1O_2	Baraka	Brotos
V_1O_3	Baraka	Folhas
V_2O_1	Contenda	Gema + Estolão
V_2O_2	Contenda	Brotos
V_2O_3	Contenda	Folhas
V_3O_1	Elvira	Gema + Estolão
V_3O_2	Elvira	Brotos
V_3O_3	Elvira	Folhas

3.3. PROCEDÊNCIA DOS TUBÉRCULOS DE BATATA.

3.3.1. TUBÉRCULOS CONTROLES INFECTADOS E SADIOS

Para a realização do teste DAS-ELISA houve a necessidade da utilização de controles positivos (batata infectada com os vírus PLRV, PVX e PVY) bem como, dos controles negativos (batata comprovadamente sadia). Foram utilizados os controles positivos e negativos originários da coleção mantida na Seção de Fitopatologia-Virologia Vegetal do Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti, tendo sido utilizados 10 tubérculos para cada vírus e o mesmo número para os controles sadios.

3.3.2. TUBÉRCULOS DAS VARIEDADES

Os tubérculos das variedades Baraka e Elvira foram doados pelo produtor de batata consumo Sr. Antônio Zesutko (Capoeira Grande-Araucária-PR) e os da variedade Contenda por Germaninho Krzyzanowski (Tietê-Araucária-PR), todas netas de caixas, segunda geração de multiplicação, colhidas inteiramente ao acaso na época da colheita e armazenadas em caixas com 300 tubérculos, com tamanho aproximado de 30 mm, destinando-se ao plantio das águas, safra 98/99.

Para a realização dos experimentos foram utilizados 100 tubérculos de cada variedade, acondicionados em sacos de papel devidamente identificados e estocados no laboratório de Virologia, em condições ambientais. Após a retirada da gema apical + estolão para a realização do teste DAS-ELISA, retornaram à embalagem original onde permaneceram até a brotação (quebra de dormência natural) sendo feita, nesta fase, nova amostragem para o teste. Os tubérculos foram mantidos, até o rebrote, nas mesmas condições anteriores, sendo então plantados em vasos para obtenção de plantas doadoras de folhas para o teste.

3.3.3. DESCRIÇÃO DAS VARIEDADES

As descrições das variedades Baraka, Contenda e Elvira utilizadas neste trabalho são as que se seguem:

VARIEDADE BARAKA

Espécie : Batata (*Solanum tuberosum* L.)

Nome da variedade : Baraka

Entidade Criadora : Holanda

Progenitores : SPV 50-358 X AVENIR

Aspectos Agronômicos (CATALOGO HOLANDES, 1994; 1997) :

Ciclo Tardio (110 a 115 dias);

Moderadamente susceptível à *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, 1876, das folhas;

Muito pouco susceptível à *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, 1876, dos tubérculos;

Pouco susceptível ao vírus do enrolamento das folhas (PLRV);

Muito pouco susceptível ao vírus Y^N e X;

Imune ao vírus A .

Aspectos Agronômicos (ENSAIOS ESTADO PARANÁ - IAPAR -1991/95)

Pesquisador responsável : Engenheiro Agrônomo M. Sc. Carlos A . Scotti.

Ciclo Tardio (113,9 dias);

Medianamente susceptível à *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, 1876;

Medianamente susceptível à *Alternaria solani* Sorauer, 1896;

Susceptível à *Pseudomonas (Ralstonia) solanacearum* Smith, 1914.

VARIEDADE CONTENDA

Espécie : Batata (*Solanum tuberosum* L.)

Nome da variedade : Contenda

Entidade criadora : BRASIL (IAPAR, EMATER-PR e EMBRAPA-CNPH)

Progenitores : Origem Genética desconhecida.

Aspectos Agronômicos (CATALOGO DO IAPAR, EMBRAPA- SPSB/CNPH) :

Ciclo médio (90 à 100 dias);

Alta resistência à infecção do vírus do enrolamento da folha (PLRV), em níveis mais elevados do que Bintje e Elvira, pois plantas infectadas raramente mostram sintomas severos;

Apresenta resistência ao vírus Y similar à da variedade Aracy;

É de resistência mediana *Alternaria solani* Sorauer, 1896, e *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, 1876;

É moderadamente resistente à *Streptomyces scabies* (Thaxter) Waksman e Henrici;

É susceptível à *Pseudomonas (Ralstonia) solanacearum* Smith, 1914;

Adapta-se bem as condições edafoclimáticas das regiões de batata-consumo

do 1º planalto paranaense, onde chegou a ocupar aproximadamente 40% da área cultivada na região metropolitana de Curitiba-PR.

Aspectos Agronômicos (ENSAIO ESTADO PARANÁ - IAPAR- 1991-1995) :

Pesquisador responsável : Engenheiro Agrônomo M.Sc. Carlos A . Scotti.

Ciclo - 91 dias;

Susceptível à *Pseudomonas (Ralstonia) solanacearum* Smith, 1914, e *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, 1876;

Medianamente resistente à *Alternaria solani* Sorauer, 1896, e ao vírus do enrolamento das folhas (PLRV);

Resistente ao vírus Y.

VARIEDADE ELVIRA

Espécie : Batata (*Solanum tuberosum* L.)

Nome da variedade : Elvira

Entidade criadora : HOLANDA

Progenitores : Clivia X 6430/1020

Aspectos Agronômicos (CATALOGO HOLANDES E MARA-BR) :

Ciclo Semi-Precoce (96 dias)

Bastante susceptível à *Phytophthora infestans* das folhas (Mont.) de Bary, 1876;

Pouco susceptível à *Phytophthora infestans* dos tubérculos (Mont.) de Bary,

1876, *Alternaria solani* Sorauer, 1896, *Erwinia* spp. Winslow e Hal., 1917, *Rhizoctonia solani* Kühn, 1858, e *Helminthosporium solani* Dur. E Mont., 1849; Susceptível a *Pseudomonas (Ralstonia) solanacearum* Smith, 1914; Resistente ao vírus X e A e ao cancro; Moderadamente susceptível ao vírus Y^N; Resistente ao patotipo A do nematoide *Globodera rostochiensis* (Wollenwebewr, 1923) Behrens, 1975.

Aspectos Agronômicos(ENSAIO ESTADO PARANÁ -IAPAR- 1991-1995) :

Pesquisador responsável: Engenheiro Agrônomo M.Sc. Carlos A . Scotti.

Ciclo - 100 dias;

Susceptível à *Pseudomonas (Ralstonia) solanacearum* Smith, 1914, *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, 1876, *Alternaria solani* Sorauer, 1896, e ao vírus do enrolamento das folhas PLRV.

3.4. PREPARO DO SOLO E PLANTIO.

3.4.1. PREPARO DO SOLO

Foram utilizadas cerca de 2 toneladas de solo, sendo 1,2 t. obtidas no Setor de Ciências Agrárias-UFPR adubadas, de acordo com a análise do solo, emitida pelo Departamento de Solos-UFPR, com fertilizantes simples, uréia, fritas e boro doados pelo Fabricante Solo Vivo Ind. Com. de Fertilizantes Ltda., Araucária-PR. Este solo foi utilizado para o plantio dos tubérculos de Baraka, Contenda e Elvira. O restante do

solo 0,8 t., foi adquirido de empresa de jardinagem, já adubado com fertilizante mineral e adubo orgânico (esterco de cavalo), e utilizado para plantio dos tubérculos dos controles positivos infectados com os vírus PLRV, PVX e PVY e também, dos controles negativos, tubérculos comprovadamente sadios. As 2 toneladas de solo foram desinfestadas com Brometo de Metila (04 latas), de acordo com a finalidade e recomendação técnica do fabricante.

3.4.2. PLANTIO

3.4.2.1. Plantio dos controles infectados por vírus e sadios.

Procedeu-se ao plantio escalonado dos controles com o vírus PLRV, PVX, PVY e sadios com intervalo aproximado de duas semanas, sendo a metade deles plantados dois meses antes do início do teste DAS-ELISA e a outra metade 30 dias após. Os tubérculos foram plantados em vasos de cerâmica com capacidade para 7,0 l de solo, sendo feitas 10 repetições para cada controle. Os controles, antes de sua utilização como padrões no ELISA, foram testados sorologicamente para comprovação da presença (controles positivos) ou não de vírus (controles negativos).

3.4.2.2. Plantio dos tubérculos rebrotados das variedades Baraka, Contenda e Elvira

Na casa de vegetação foram plantados 100 tubérculos de cada variedade, após o rebrote em laboratório, em vasos de plásticos de cor preta, com capacidade para 0,5 l de solo, sendo que 100 vasos de cada variedade foram dispostos na mesa,

em arranjo de 5 blocos de 20 vasos devidamente identificados por etiquetas adesivas e estacas. Para cada variedade foi utilizada uma mesa.

Na fase de pleno desenvolvimento das plantas, 45 dias após a germinação, foram realizadas coletas de folhas para obtenção dos antígenos a serem utilizados no DAS-ELISA.

3.5. PROTOCOLO DAS-ELISA PARA DETECÇÃO DE PLRV, PVX E PVY

Estabeleceu-se um protocolo com o mapeamento da distribuição das amostras nas microplacas de acordo com o delineamento do experimento, Apêndice I a IV.

O método imunológico DAS-ELISA utilizado foi do tipo sanduíche de duplo anticorpo subdividido em 04 etapas, metodologia utilizada por Clark, M. F. e A. N. Adams (1977), segundo SALAZAR (1995).

3.5.1. 1ª ETAPA : ADERÊNCIA DOS ANTICORPOS ESPECÍFICOS DOS VÍRUS.

A primeira etapa do teste consistiu em aderir aos poços das microplacas os anticorpos (IgG) específicos de PVX, PVY e PLRV. Inicialmente, os antisoros específicos dos vírus provenientes da EMBRAPA-CNPH foram diluídos na proporção de 1:1000 em tampão de carbonato ou adsorção - COATING BUFFER, (Apêndice VIII-1), em três placas de Petri, uma para cada vírus.

Em seguida, homogeneizou-se e distribuiu-se alíquotas da diluição preparada, a base de 150 µl, por poço da microplaca; de conformidade com mapeamento de distribuição das amostras previamente elaborado constando inclusive a localização

dos controles positivos (com antígenos) e negativos (sadios).

Após distribuição dos anticorpos específicos e controles nas respectivas microplacas, estas foram colocadas na estufa por 4 a 6 horas à temperatura de 37° C, em uma bandeja tampada forrada com papel toalha úmido (câmara úmida).

Materiais utilizados : placas de Petri (03), microplacas de fundo chato (04 de 96 poços cada), pipeta volumétrica (01 de 20 ml), pipeta monocal (01 de 40 µl), pipeta multicanal (01 com 08 canais de 200 µl), ponteiras diferentes para cada vírus (34 de 200 µl), bandeja hermeticamente fechada (01), papel toalha (01), pissete (01 de 500 ml).

3.5.2. 2ª ETAPA : ADERÊNCIA DOS ANTÍGENOS.

Na segunda etapa procedeu-se a lavagem das microplacas por três vezes com tampão PBS - Tween 20 (Apêndice V-4).

Foram utilizados os antígenos obtidos a partir de suco de tecido de gema dormente + estolão, de brotos e de folhas, seguindo-se a descrição da metodologia de obtenção de cada um deles.

3.5.2.1. Obtenção dos antígenos a partir de tecidos de gemas apical + estolão e distribuição nas microplacas.

O método de extração foi baseado no trabalho de SOUZA DIAS **et al.**, 1997, e consistiu na extração de suco de uma única gema apical + estolão (área cicatricial do estolão no tubérculo da batata) e/ou gema lateral próxima ao estolão, por meio de um

equipamento odontológico Mini Motor, 0/15000 RPM, 80 W, 50/60 HZ, 110 Volt, marca Bethil, com pedal acelerador e ponteira de ponta chata usada na perfuração dos tubérculos até a profundidade de 5 mm o suficiente para extrair pequena quantidade de suco.

Estas alíquotas obtidas foram colocadas diretamente nos poços da microplaca contendo a quantia de 100 μ l por poço do tampão específico de diluição (Apêndice VIII-2) pipetada minutos antes do início da distribuição dos sucos, logo após a lavagem das microplacas no final da primeira etapa. A cada extração de suco dos diversos tubérculos, as microplacas permaneceram em bandeja plástica com pedras de gelo o tempo necessário para a lavagem com água destilada da ponteira, procedimento repetido a cada troca de tubérculo até a conclusão da distribuição em todas as microplacas.

Materiais utilizados : pissete de lavagem (03 de 500 ml), pipeta multicanal (08 canais de 200 μ l), ponteiras (18 de 200 μ l), equipamento odontológico - Mini Motor-Bethil (01), saquinhos plásticos transparentes (330), pissete (01 de 1000 ml), bandeja com gelo (01), bandeja plástica com tampa (01), papel toalha (01), bandeja suporte de microtubos (02 de 96 poços cada), microtubos (330 de 1,2 ml), pipetas monocanais (01 de 200 e 01 de 1000 μ l), cubeta (01) para tampão, ponteiras (330 de 1000 μ l), bandeja plástica com tampa (01) e as mesmas quatro microplacas.

3.5.2.2. Obtenção dos antígenos a partir de tecidos de brotos apical e lateral e distribuição nas microplacas.

As brotações dos tubérculos armazenados, brotos apical e laterais de cada

tubérculo de tamanho igual e/ou superior a 1 cm foram retiradas utilizando-se sacos plásticos transparentes, devidamente identificados, sem o contato direto das mãos nos brotos, com o objetivo de evitar possíveis transmissões. Em seguida, os brotos foram macerados manualmente nos próprios sacos, e o suco extraído foi diluído na proporção de 1 : 10, ou seja, uma quantia de 100 µl do suco para 900 µl do tampão específico de diluição (Apêndice VIII-2), sendo distribuídas em microtubos de 1,2 ml dispostos em três bandejas suporte com capacidade para 96 microtubos, mantendo-se o mapeamento previamente elaborado de distribuição das amostras.

Em seguida, distribuiu-se uma alíquota de 100 µl da diluição do suco por poço da microplaca e ao final da distribuição de todas as amostras as microplacas foram colocadas em bandeja tampada (câmara úmida) permanecendo em geladeira, para aderência dos antígenos, à temperatura de 8° C, por um período de 12 horas.

Materiais utilizados: Sacos plásticos transparentes (110 -10 x 15 cm), câmara úmida (01), bandeja suporte para microtubos (02 de 96 poços), microtubos (110 de 1,2 ml), pipetas monocanaís (02 de 250 e 1000 µl), cubeta (01), ponteiras (110 de 1000 µl), bandeja plástica com tampa (01) e microplacas (04).

Os tubérculos de batata doadores dos brotos retornaram ao saco de papel original, sendo colocados em uma bandeja plástica até o rebrote, sendo então plantados para obtenção das folhas utilizadas na extração dos antígenos.

3.5.2.3. Obtenção dos antígenos a partir de tecidos de folhas e distribuição nas microplacas

Os tubérculos rebrotados em laboratório foram plantados na casa de vegetação

em vasos.

A coleta de folhas foi a partir dos 45 dias após a germinação, iniciando-se com a variedade Elvira, planta por planta, utilizando-se saco plástico para evitar-se o contato direto das mãos com as folhas e possíveis transmissões. No laboratório as folhas foram maceradas manualmente dentro do saco, sendo o suco extraído diluído na proporção de 1 : 10, ou seja, 100 µl do suco para 900 µl do tampão específico de diluição (Apêndice VIII-2), sendo distribuídas em microtubos de 1,2 ml dispostos em três bandejas suporte com capacidade para 96 microtubos, mantendo-se o mapeamento previamente elaborado de distribuição das amostras. Em seguida, distribuiu-se uma alíquota de 100 µl da diluição do suco por poço da microplaca e ao final da distribuição de todas as amostras as microplacas foram colocadas em bandeja tampada (câmara úmida) para aderência dos antígenos permanecendo em geladeira a temperatura de 8° C, por período de 12 horas.

Materiais utilizados: Sacos plásticos transparentes (110- 10 x 15 cm), câmara úmida (01), bandeja suporte para microtubos (02 de 96 poços), microtubos (110 de 1,2 ml), pipetas monocanaís (02 de 250 e 1000 µl), cubeta (01), ponteiras (110 de 1000 µl), bandeja plástica com tampa (01) e microplacas (04).

Os mesmos procedimentos foram adotados para as plantas das outras duas variedades Baraka e Contenda e plantas controles.

3.5.3. 3ª ETAPA: ADIÇÃO DO CONJUGADO ENZIMÁTICO ESPECÍFICO.

Na terceira etapa, após 24 horas do início do teste, as microplacas foram retiradas da geladeira, realizando-se a lavagem das mesmas, poço a poço, por 3

vezes com PBS - Tween 20.

Em seguida, preparou-se a diluição do conjugado enzimático específico para cada antisoro na proporção de 1:1000, em três placas de Petri, uma para cada vírus, usando o tampão específico do IgG conjugado (Apêndice VIII-2).

A seguir, homogeneizou-se e distribuiu-se alíquotas de 100 µl da diluição por poço nas quatro microplacas, com os anticorpos já aderidos (primeira etapa) e os sucos das amostras (antígenos- segunda etapa). A seguir as microplacas foram colocadas em bandeja com tampa e papel úmido (câmara úmida) e mantidas em estufa à temperatura de 37° C, para aderência dos conjugados específicos, por um período de 4 a 6 horas.

Após este período, procedeu-se à lavagem, por cinco vezes, das microplacas com solução do PBS-TWEEN 20, procurando-se eliminar todos os resíduos dos poços e evitando-se, desta forma, reações inespecíficas.

Materiais utilizados : pissete (03 de 500 ml), placas de Petri (03), pipeta volumétrica (01de 20 ml), pipeta monocal (01de 50 µl), pipeta multicanal (01 de 8 canais- 200 µl), ponteiras(30), bandeja plástica com tampa(01), microplacas (04).

3.5.4. 4ª ETAPA: ADIÇÃO DE FOSFATASE ALCALINA E LEITURA DAS REAÇÕES.

A quarta etapa iniciou-se após a terceira lavagem, com a adição da fosfatase alcalina à base de 100 µl por poço para a revelação da presença ou ausência do vírus nas amostras.

A solução de fosfatase alcalina foi obtida misturando-se 0,018 mg da fosfatase em 20 ml do tampão específico (Apêndice VIII-3), sendo que a quantidade de

conjugado unido na terceira etapa, determinou a adição do substrato de fosfatase alcalina específica na quarta e última etapa.

Após a distribuição das alíquotas, de 100 µl da fosfatase alcalina por poço as microplacas foram colocadas em bandeja plástica tampada e armazenadas em local escuro e fechado (gaveta), aguardando-se o período adequado, para obtenção das reações indicativas da presença de vírus (cor amarela) ou ausência de vírus (sem cor). O tempo de revelação para o PVX e PVY foi de 15 minutos e de até uma hora para o PLRV. As interpretações das reações obtidas nas microplacas foram avaliadas por leitura visual e por leitora de ELISA.

Materiais utilizados : pissete (03 de 500 ml), Erlenmeyer marrom escuro (01 de 500 ml), pipeta volumétrica (01 de 20 ml), balança analítica (01), agitador (01), cubeta (01), pipeta multicanal (01 com 08 canais de 200 µl), ponteiras (08), bandeja plástica com tampa (01) microplacas (04).

3.6. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS NAS MICROPLACAS POR LEITURA VISUAL E POR LEITORA DE ELISA

As reações referentes à presença de cor amarela (com vírus) ou não (sem vírus) nas microplacas foram avaliadas visualmente e os resultados anotados no protocolo de distribuição das amostras. Em seguida, as microplacas foram colocadas em equipamento de interpretação de resultados conhecido como Leitora de ELISA, equipamento automatizado controlado por microprocessador, designado a medir a densidade óptica de amostras em microplacas, modelo 340 ATC da SLT Labinstruments Ges. m. b. H. - AUSTRIA/EUROPE, num comprimento de onda de

405 nm, padronizando-se o valor de até 2 x NC (Controle Negativo), o limite das amostras sadias, Apêndices VI a VIII. Os resultados obtidos pela leitora de ELISA foram anotados em protocolo similar ao da leitura visual.

3.7. CONSIDERAÇÕES SOBRE O USO DE LEITURA VISUAL E LEITORA DE ELISA

Como forma de comparar os resultados obtidos pelas leituras na leitora de ELISA e visual, foram criados dois índices, denominados de índice de regularidade e índice de igualdade.

O índice de regularidade consiste na razão entre as médias dos tratamentos obtidas nas duas leituras, onde o numerador é sempre a média que apresentou maior valor. Desta forma o resultado, em porcentagem, sempre indica qual das leituras apresentou maior número de valores negativos. O resultado ideal é a unidade, indicando que as duas leituras tiveram o mesmo resultado no teste DAS - ELISA. O índice de regularidade foi calculado considerando os tratamentos e vírus avaliados.

O índice de igualdade é a comparação direta entre os resultados positivos e negativos obtidos na leitora de ELISA e visual, para cada uma das cinco repetições do experimento. A razão indica em porcentagem, por tratamento e tipo de vírus, o número acumulado de acertos, ao mesmo tempo, tanto para os resultados positivos como para os negativos, nas duas leituras. Cada repetição cujos resultados foram iguais em ambas as leituras contribuíram com 1/5 do valor máximo do índice.

A elaboração destes índices visou auxiliar as inferências feitas à partir dos resultados obtidos na análise estatística, permitindo recomendar de forma mais

consistente quais as origens de tecido vegetal a serem utilizadas na detecção dos vírus estudados.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. CONSIDERAÇÕES SOBRE A ANÁLISE ESTATÍSTICA.

Foram utilizados os resultados numéricos negativos do teste DAS - ELISA ao invés do número de resultados positivos como usualmente é feito, tendo em vista que foi encontrada uma grande quantidade de valores zero, o que inviabilizaria a análise estatística dos dados. Isto implica que na interpretação dos resultados os tratamentos com as menores médias são os mais eficientes na detecção dos vírus estudados, correspondendo, na realidade, aos tratamentos com maior número de resultados positivos os quais representam a efetiva detecção dos vírus estudados.

Os dados obtidos, por se tratarem de contagens, foram transformados por raiz quadrada de $(x + 1)$ e as análises foram realizadas com estes valores transformados sendo, no entanto, os resultados reportados na escala original.

Todas as variáveis estudadas apresentaram variâncias dos tratamentos homogêneas segundo os resultados obtidos para o teste de BARTLETT.

Por meio da tabela 02 verifica-se que, para todas as variáveis estudadas, a interação dos fatores (Variedades x Origens de tecido) foi estatisticamente significativa ($p < 0,01$), indicando que os seus efeitos não são independentes. Isto implica que todas

as comparações de médias devem ser feitas levando-se em conta ou cada uma das variedades utilizadas ou cada uma das origens de tecidos vegetais, sendo que, no presente, optou-se pela comparação das médias para cada uma das variedades. Os fatores principais, variedade e origens de tecido, também apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,01$).

TABELA 2 – RESULTADOS DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA OS VÍRUS PLRV, PVX E PVY NOS DIFERENTES TECIDOS VEGETAIS (GEMA APICAL MAIS ESTOLÃO, BROTO E FOLHAS) NA BATATA *S. tuberosum*, VARIEDADES BARAKA, CONTENDA E ELVIRA, OBTIDOS NO TESTE DAS-ELISA POR MEIO DA LEITORA DE ELISA E LEITURA VISUAL.

FONTES DE VARIAÇÃO	GRAUS DE LIBERDADE	QUADRADOS MÉDIOS					
		VÍRUS (LE)			VÍRUS (LV)		
		PLRV 1	PVX 1	PVY 1	PLRV 2	PVX	PVY 2
Variedades	2	0,429**	0,002**	14,040**	0,680**	0,009**	5,541**
Origens	2	0,186*	0,008**	6,793**	1,355**	0,002**	2,139**
Variedades X Origens	4	0,282**	0,004**	1,302**	1,320**	0,004**	0,495**
Erro	36	0,043	0,026	0,145	0,033	0,016	0,068
Coeficiente de Variação (%)		4,96	3,64	12,13	6,30	3,72	13,77
χ^2		13,701 ^{ns}	10,685 ^{ns}	17,936 ^{ns}	14,373 ^{ns}	14,963 ^{ns}	17,104 ^{ns}

^{ns} = não significativo

χ^2 = Teste de Bartlett

* = significativo ao nível de 5%

(LE) = Leitora de ELISA

** = significativo ao nível de 1%

(LV) = Leitura VISUAL

NOTA : Dados extraídos do Programa MSTATC, versão 2.11.

4.2. RESULTADOS DA DETECÇÃO DE VÍRUS EM DIFERENTES ORIGENS DE TECIDOS VEGETAIS DA BATATA, VARIEDADE BARAKA.

4.2.1. RESULTADOS REFERENTES À LEITURA VISUAL DO TESTE DAS-ELISA.

Os resultados do teste de comparação das médias dos tratamentos, feitos por leitura visual, para a variedade Baraka, para os três vírus estudados usando como origem do tecido vegetal a gema apical + estolão, os brotos e as folhas, são apresentados na tabela 3.

Para o PLRV e PVX não foram verificadas diferenças estatisticamente significantes entre as médias do número de casos negativos. Isto significa que pode-se utilizar qualquer uma das origens dos tecidos vegetais para o diagnóstico destes vírus para a variedade Baraka.

Para o PVY, as médias do número de casos negativos apresentaram diferenças estatisticamente significativas e menores entre as origens dos tecidos vegetais brotos e folhas em relação a origem gema apical + estolão. Desta forma os tecidos vegetais indicados para a detecção do PVY são os brotos e as folhas.

TABELA 3 - RESULTADOS DO TESTE DE TUKEY PARA A COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DOS TRATAMENTOS ESTUDADOS, COM OS RESPECTIVOS DESVIOS PADRÕES, DAS LEITURAS VISUAIS NEGATIVAS NA DETECÇÃO DE PLRV, PVX e PVY NA BATATA, VARIEDADE BARAKA.

VÍRUS	ORIGEM DOS TECIDOS VEGETAIS		
	GEMA + ESTOLÃO	BROTOS	FOLHAS
PLRV	19,00 ± 1,22 a ¹	18,60 ± 1,14 a	17,00 ± 1,87 a
PVX	19,80 ± 0,45 a	20,00 ± 2,24 a	20,00 ± 1,14 a
PVY	9,20 ± 1,92 a	4,60 ± 3,58 b	4,60 ± 2,30 b

¹ média de 5 repetições.

Médias seguidas da mesma letra na horizontal, não diferem estatisticamente pelo teste de TUKEY, ao nível de 5% de probabilidade.

4.2.2. RESULTADOS REFERENTES À LEITORA DE ELISA DO TESTE DAS-ELISA.

Os resultados do teste de comparação das médias dos tratamentos, realizados na leitora de ELISA, para a variedade Baraka, para os três vírus estudados usando como origens do tecido vegetal a gema apical + estolão, os brotos e as folhas, são apresentados na tabela 4.

Para o PVX não foram verificadas diferenças estatisticamente significantes entre as médias do número de casos negativos. Nesta situação pode-se utilizar qualquer uma das origens do tecido para a detecção do PVX em batata, variedade Baraka. Para o PLRV não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias do número de casos negativos para as origens do tecido vegetal gema + estolão e folhas, sendo que as mesmas foram superiores aos brotos. Neste caso os brotos devem ser utilizados como fonte de material vegetal para a detecção do PLRV na variedade Baraka. Para o PVY as médias do número de casos negativos apresentaram diferenças estatisticamente significativas e menores entre as origens

dos tecidos vegetais brotos e folhas em relação ao tecido de gema apical + estolão, indicando que os tecidos vegetais para a detecção do PVY são os brotos e folhas.

TABELA 4 - RESULTADOS DO TESTE DE TUKEY PARA A COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DOS TRATAMENTOS ESTUDADOS, COM OS RESPECTIVOS DESVIOS PADRÕES, DAS LEITURAS REALIZADAS PELA LEITORA DE ELISA NEGATIVAS NA DETECÇÃO DE PLRV, PVX e PVY NA BATATA, VARIEDADE BARAKA.

VÍRUS	ORIGEM DOS TECIDOS VEGETAIS		
	GEMA + ESTOLÃO	BROTOS	FOLHAS
PLRV	19,80 ± 0,45 a ¹	14,20 ± 2,39 b	17,40 ± 1,14 a
PVX	19,80 ± 0,45 a	20,00 ± 1,41 a	20,00 ± 1,41 a
PVY	9,00 ± 2,45 a	3,60 ± 2,70 b	4,60 ± 2,30 b

¹ média de 5 repetições.

Médias seguidas da mesma letra na horizontal, não diferem estatisticamente pelo teste de TUKEY, ao nível de 5% de probabilidade.

4.3. RESULTADOS DA DETECÇÃO DE VÍRUS EM DIFERENTES TECIDOS VEGETAIS DA BATATA, VARIEDADE CONTENDA.

4.3.1. RESULTADOS REFERENTES À LEITURA VISUAL DO TESTE DAS -ELISA.

Os resultados do teste de comparação das médias dos tratamentos, feitos por leitura visual, para a variedade Contenda, para os três vírus estudados usando como origens do tecido vegetal a gema apical + estolão, os brotos e as folhas, são apresentados na tabela 5.

Para o PVX e PVY não foram verificadas diferenças estatisticamente significantes entre as médias do número de casos negativos. Isto possibilita inferir que pode-se utilizar qualquer um dos tecidos vegetais para o diagnóstico destes vírus para

a variedade Contenda.

Para o PLRV, as médias do número de casos negativos apresentaram diferenças estatisticamente significativas e maiores entre as origens dos tecidos vegetais brotos e folhas em relação a gema apical + estolão. Neste caso o tecido indicado para a detecção do PLRV é a gema + estolão.

TABELA 5 - RESULTADOS DO TESTE DE TUKEY PARA A COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DOS TRATAMENTOS ESTUDADOS, COM OS RESPECTIVOS DESVIOS PADRÕES, DAS LEITURAS VISUAIS NEGATIVAS NA DETECÇÃO DE PLRV, PVX e PVY NA BATATA, VARIEDADE CONTENDA.

VÍRUS	ORIGEM DOS TECIDOS VEGETAIS		
	GEMA + ESTOLÃO	BROTOS	FOLHAS
PLRV	5,00 ± 2,00 b ¹	20,00 ± 1,41 a	18,20 ± 1,30 a
PVX	20,00 ± 1,41 a	19,80 ± 0,45 a	20,00 ± 1,58 a
PVY	17,80 ± 1,30 a	15,60 ± 2,70 a	16,60 ± 1,14 a

¹ média de 5 repetições.

Médias seguidas da mesma letra na horizontal, não diferem estatisticamente pelo teste de TUKEY, ao nível de 5% de probabilidade.

4.3.2. RESULTADOS DA LEITORA DE ELISA NO TESTE DAS-ELISA.

Os resultados do teste de comparação das médias dos tratamentos, realizados na leitora de ELISA, para a variedade Contenda, para os três vírus estudados usando como origens do tecido vegetal a gema apical + estolão, os brotos e as folhas, são apresentados na tabela 6.

Para todos os vírus estudados, PLRV, PVX e PVY não foram verificadas diferenças estatisticamente significantes entre as médias do número de casos negativos. Nesta situação pode-se utilizar qualquer uma das origens para a detecção

do PLRV, PVX e PVY na variedade Contenda.

TABELA 6 - RESULTADOS DO TESTE DE TUKEY PARA A COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DOS TRATAMENTOS ESTUDADOS, COM OS RESPECTIVOS DESVIOS PADRÕES, DAS LEITURAS REALIZADAS PELA LEITORA DE ELISA NEGATIVAS NA DETECÇÃO DE PLRV, PVX e PVY NA BATATA, VARIEDADE CONTENDA.

VÍRUS	ORIGEM DOS TECIDOS VEGETAIS		
	GEMA + ESTOLÃO	BROTOS	FOLHAS
PLRV	20,00 ± 1,41 a ¹	20,00 ± 1,41 a	17,60 ± 2,30 a
PVX	20,00 ± 1,41 a	20,00 ± 2,12 a	19,60 ± 0,89 a
PVY	19,80 ± 1,48 a	16,40 ± 1,14 a	16,60 ± 1,14 a

¹ média de 5 repetições.

Médias seguidas da mesma letra na horizontal, não diferem estatisticamente pelo teste de TUKEY, ao nível de 5% de probabilidade.

4.4 RESULTADOS DA DETECÇÃO DE VÍRUS EM DIFERENTES ORIGENS DE TECIDOS VEGETAIS DA BATATA, VARIEDADE ELVIRA.

4.4.1 RESULTADOS DA LEITURA VISUAL DO TESTE DAS-ELISA.

Os resultados do teste de comparação das médias dos tratamentos, feitos por leitura visual, para a variedade Elvira, para os três vírus estudados usando como origens do tecido vegetal a gema apical + estolão, os brotos e as folhas, são apresentados na tabela 7.

Para o PLRV e PVX não foram verificadas diferenças estatisticamente significantes entre as médias do número de casos negativos. Isto significa que pode-se utilizar qualquer um dos tecidos vegetais para o diagnóstico destes vírus para a variedade Elvira.

Para o PVY, as médias do número de casos negativos apresentaram

diferenças estatisticamente significativas e menores entre as origens dos tecidos vegetais brotos e folhas em relação a gema apical + estolão, mostrando que os tecidos vegetais indicados para a detecção do PVY são os brotos e as folhas.

TABELA 7 - RESULTADOS DO TESTE DE TUKEY PARA A COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DOS TRATAMENTOS ESTUDADOS, COM OS RESPECTIVOS DESVIOS PADRÕES, DAS LEITURAS VISUAIS NEGATIVAS NA DETECÇÃO DE PLRV, PVX e PVY NA BATATA, VARIEDADE ELVIRA.

VÍRUS	ORIGEM DOS TECIDOS VEGETAIS		
	GEMA + ESTOLÃO	BROTOS	FOLHAS
PLRV	15,60 ± 3,29 a ¹	17,00 ± 1,22 a	16,40 ± 1,52 a
PVX	19,20 ± 1,79 a	20,00 ± 1,87 a	19,20 ± 0,84 a
PVY	16,00 ± 3,08 a	5,60 ± 1,52 b	4,40 ± 1,52 b

¹ média de 5 repetições.

Médias seguidas da mesma letra na horizontal, não diferem estatisticamente pelo teste de TUKEY, ao nível de 5% de probabilidade.

4.4.2. RESULTADOS DA LEITORA DE ELISA NO TESTE DAS-ELISA.

Os resultados do teste de comparação das médias dos tratamentos, feitos por leitora de ELISA, para a variedade Elvira, para os três vírus estudados usando como origens do tecido vegetal a gema apical + estolão, os brotos e as folhas, são apresentados na tabela 8.

Para o PLRV e PVX não foram verificadas diferenças estatisticamente significantes entre as médias do número de casos negativos. Pode-se inferir destes resultados que qualquer um dos tecidos vegetais pode ser utilizado para o diagnóstico destes vírus para a variedade Elvira.

Para o PVY, as médias do número de casos negativos apresentaram diferenças estatisticamente significativas e menores entre as origens dos tecidos

vegetais brotos e folhas em relação a origem gema apical + estolão, sendo que devido a isto os tecidos vegetais indicados para a detecção do PVY são os brotos e as folhas.

TABELA 8 - RESULTADOS DO TESTE DE TUKEY PARA A COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DOS TRATAMENTOS ESTUDADOS, COM OS RESPECTIVOS DESVIOS PADRÕES, DAS LEITURAS REALIZADAS PELA LEITORA DE ELISA NEGATIVAS NA DETECÇÃO DE PLRV, PVX e PVY NA BATATA, VARIEDADE ELVIRA.

VÍRUS	ORIGEM DOS TECIDOS VEGETAIS		
	GEMA + ESTOLÃO	BROTOS	FOLHAS
PLRV	16,20 ± 2,17 a ¹	16,80 ± 1,10 a	16,40 ± 1,52 a
PVX	20,00 ± 1,41 a	20,00 ± 2,12 a	19,20 ± 0,84 a
PVY	18,60 ± 1,95 a	5,60 ± 1,52 b	4,60 ± 1,95 b

¹ média de 5 repetições.

Médias seguidas da mesma letra na horizontal, não diferem estatisticamente pelo teste de TUKEY, ao nível de 5% de probabilidade.

4.5. RESULTADOS DOS ÍNDICES DE REGULARIDADE E IGUALDADE

4.5.1. RESULTADOS DO ÍNDICE DE REGULARIDADE PARA A VARIEDADE BARAKA

Os índices de regularidade para a variedade Baraka são apresentados na tabela 9.

Para o PLRV e PVY os índices de maior regularidade ocorreram quando da utilização das folhas, seguido da gema apical + estolão e por último dos brotos.

Para o PVX os índices de regularidade foram idênticos nas diferentes origens de tecido vegetal utilizado. Esta regularidade foi devido à ausência deste vírus nas amostras.

TABELA 9 - ÍNDICES DE REGULARIDADE OBTIDOS, EM PERCENTAGEM, PARA AS ORIGENS DE TECIDO VEGETAL GEMAS + ESTOLÃO, BROTO E FOLHAS PARA O PLRV, PVX E PVY NA BATATA, VARIEDADE BARAKA

VÍRUS	ORIGEM DO TECIDO VEGETAL					
	GEMA + ESTOLÃO		BROTOS		FOLHAS	
	V / E	E / V	V / E	E / V	V / E	E / V
PLRV	-	4,21	30,98	-	-	2,35
PVX	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
PVY	2,22	-	27,77	-	1,00	1,00

V = LEITURA VISUAL E = LEITURA ELISA

4.5.2. RESULTADOS DO ÍNDICE DE REGULARIDADE PARA A VARIEDADE CONTENDA

Os índices de regularidade para a variedade Contenda são apresentados na tabela 10.

Para o PLRV os índices de maior regularidade ocorreram quando da utilização dos brotos, seguido das folhas e por último da gema apical + estolão.

Para o PVX os índices de regularidade foram mais regulares nas gemas apicais + estolão, seguido pelos brotos e por último pelas folhas. Os índices verificados nas gemas + estolão foram devido à ausência deste vírus na amostra.

Para o PVY os índices de maior regularidade foram verificados nas folhas, seguido dos brotos e por último pelas gemas apicais + estolão.

TABELA 10 - ÍNDICES DE REGULARIDADE OBTIDOS, EM PERCENTAGEM, PARA AS ORIGENS DE TECIDO VEGETAL GEMAS + ESTOLÃO, BROTO E FOLHAS PARA O PLRV, PVX E PVY NA BATATA, VARIEDADE CONTENDA

VÍRUS	ORIGEM DO TECIDO VEGETAL					
	GEMA + ESTOLÃO		BROTOS		FOLHAS	
	V / E	E / V	V / E	E / V	V / E	E / V
PLRV	-	300,00	1,00	1,00	3,40	-
PVX	1,00	1,00	-	1,01	2,04	-
PVY	-	11,23	-	5,12	1,00	1,00

V = LEITURA VISUAL E = LEITURA ELISA

4.5.3. RESULTADOS DO ÍNDICE DE REGULARIDADE PARA A VARIEDADE ELVIRA

Os índices de regularidade para a variedade ELVIRA são apresentados na tabela 11.

Para o PLRV os índices de maior regularidade ocorreram quando da utilização das folhas, seguido dos brotos e por último das gemas apicais + estolão.

Para o PVX os índices de regularidade foram idênticos e unitários nas folhas e brotos seguido das gemas apicais + estolão.

Para o PVY os índices de maior regularidade foram encontrados nos brotos, seguidos das folhas e por último nas gemas apicais + estolão.

TABELA 11 - ÍNDICES DE REGULARIDADE OBTIDOS, EM PERCENTAGEM, PARA AS ORIGENS DE TECIDO VEGETAL GEMAS + ESTOLÃO, BROTO E FOLHAS PARA O PLRV, PVX E PVY NA BATATA, VARIEDADE ELVIRA

VÍRUS	ORIGEM DO TECIDO VEGETAL					
	GEMA + ESTOLÃO		BROTOS		FOLHAS	
	V / E	E / V	V / E	E / V	V / E	E / V
PLRV	-	3,84	1,19	-	1,00	1,00
PVX	-	4,16	1,00	1,00	1,00	1,00
PVY	-	16,25	1,00	1,00	-	4,54

V = LEITURA VISUAL E = LEITURA ELISA

4.5.4. RESULTADOS DO ÍNDICE DE IGUALDADE PARA A VARIEDADE BARAKA

Os índices de igualdade obtidos para a variedade BARAKA são apresentados no gráfico 1.

Para o PLRV o maior índice de igualdade foi obtido para as folhas (80%), seguido das gemas apicais + estolão (60%).

Para o PVX as três origens de tecido apresentaram igual índice de igualdade (100%), sendo estes resultados devido à ausência deste vírus nas amostras.

Para o PVY as folhas apresentaram o maior índice de igualdade (100%), seguido das gemas apicais + estolão e brotos (60%).

4.5.5. RESULTADOS DO ÍNDICE DE IGUALDADE PARA A VARIEDADE

CONTENDA

Os índices de igualdade obtidos para a variedade CONTENDA são apresentados no gráfico 2.

Para o PLRV o maior índice de igualdade foi obtido para os brotos (100%), seguido das folhas (80%) e por último as gemas apicais + estolão (20%).

Para o PVX o maior índice de igualdade ocorreu nas gemas apicais + estolão (100%), seguido dos brotos e folhas (80%).

Para o PVY as folhas apresentaram o maior índice de igualdade (100%), seguido dos brotos (80%) e por último das gemas apicais + estolão (20%).

4.5.6. RESULTADOS DO ÍNDICE DE IGUALDADE PARA A VARIEDADE ELVIRA

Os índices de igualdade obtidos para a variedade ELVIRA são apresentados no gráfico 3.

Para o PLRV o maior índice de igualdade foi obtido para as folhas (100%), seguido dos brotos e gemas apicais + estolão (80%).

Para o PVX o maior índice de igualdade ocorreu nos brotos e nas folhas (100%) seguido das gemas apicais + estolão (80%).

Para o PVY os brotos apresentaram o maior índice de igualdade (100%), seguido das folhas (60%) e por último das gemas apicais + estolão (20%).

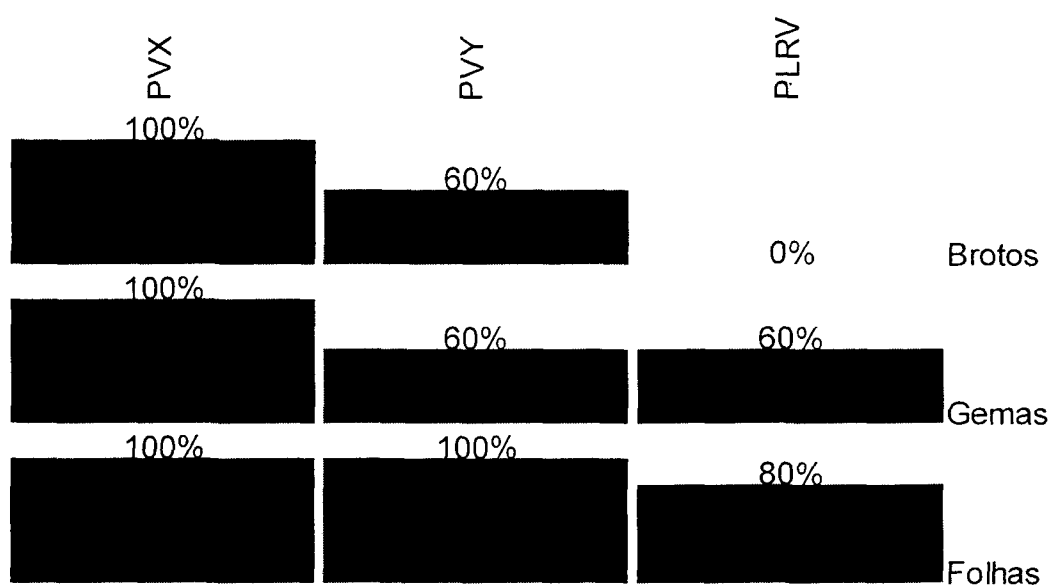


GRÁFICO 1 - ÍNDICES DE IGUALDADE ENTRE AS LEITURAS VISUAL E DA LEITORA DE ELISA, PARA O PLRV, PVX E PVY, NOS TECIDOS DE ORIGEM VEGETAL GEMA APICAL + ESTOLÃO, BROTOS E FOLHAS, PARA A VARIEDADE BARAKA.

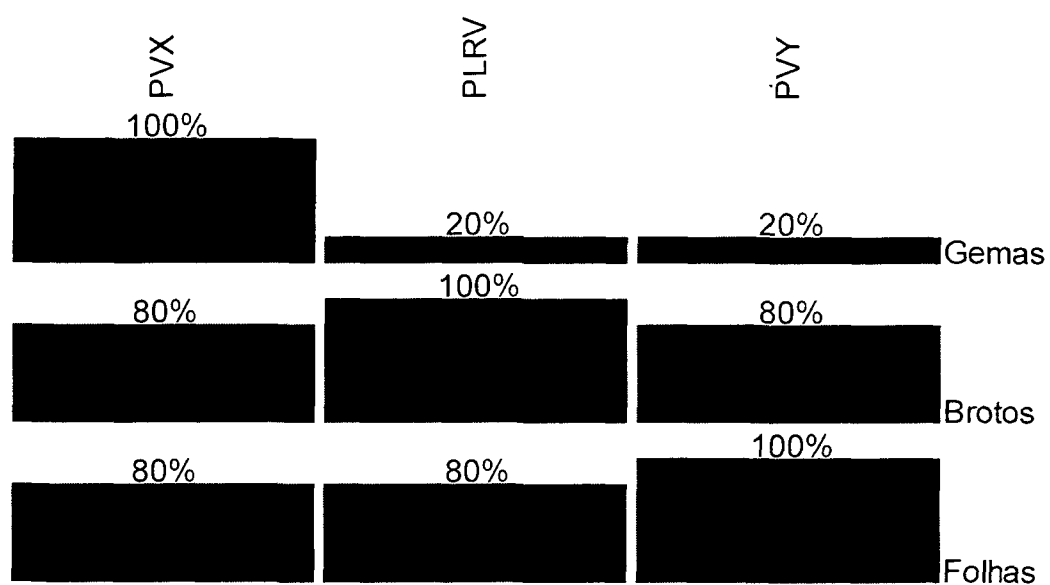


GRÁFICO 2 - ÍNDICES DE IGUALDADE ENTRE AS LEITURAS VISUAL E DA LEITORA DE ELISA, PARA O PLRV, PVX E PVY, NOS TECIDOS DE ORIGEM VEGETAL GEMA APICAL + ESTOLÃO, BROTOS E FOLHAS, PARA A VARIEDADE CONTENDA.

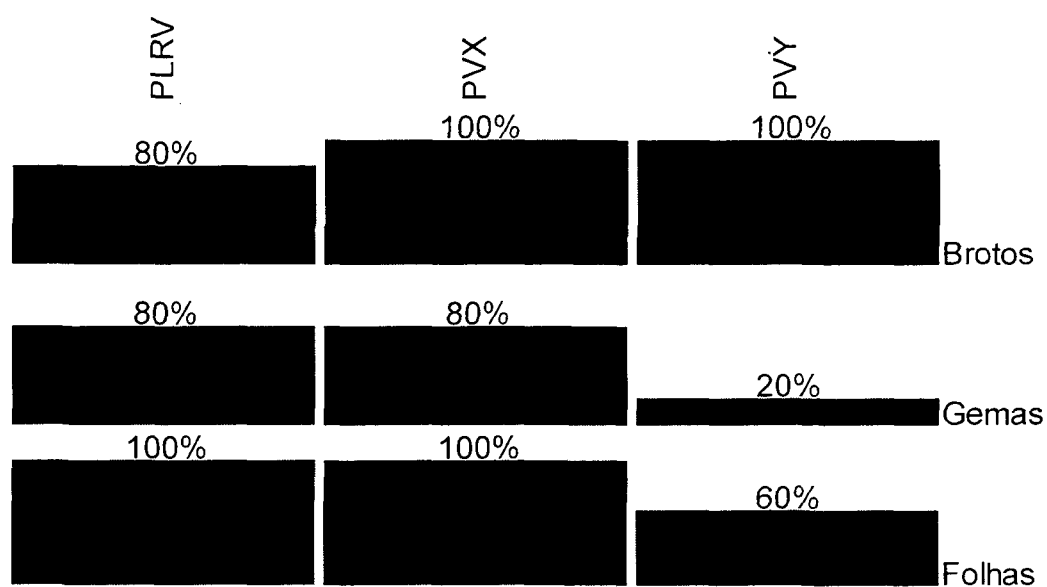


GRÁFICO 3 – ÍNDICES DE IGUALDADE ENTRE AS LEITURAS VISUAL E DA LEITORA DE ELISA, PARA O PLRV, PVX E PVY, NOS TECIDOS DE ORIGEM VEGETAL GEMA APICAL + ESTOLÃO, BROTOS E FOLHAS, PARA A VARIEDADE ELVIRA.

4.5.7. NÍVEIS DE INCIDÊNCIA DOS VÍRUS NAS VARIEDADES

Pela Tabela 12, verifica-se que, a incidência de PLRV foi diferente nas 3 variedades de batatas utilizadas, sendo a maior incidência observada na variedade Elvira (3,6%), seguindo-se a Baraka (2,3%), e por último a Contenda (0,7%). Para o PVX, os níveis médios de incidências foram bem inferiores aos do do PLRV e PVY, e, bastante baixos nas 3 variedades, sendo de 0,03% na variedade Baraka, 0,01% na variedade Contenda e 0,4% em Elvira. O PVY foi o que apresentou índices maiores de incidência em comparação com PLRV e PVY, com valores de 14.06% na variedade Baraka, 10.86% na variedade Elvira e 2.86% na variedade Contenda.

TABELA 12 - COMPARATIVO DAS PERCENTAGENS MÉDIAS DE INCIDÊNCIA DE PLRV, PVX e PVY, PARA AS TRÊS VARIEDADES UTILIZADAS.

VARIEDADES	ÍNDICES MÉDIOS DE INCIDÊNCIAS DOS VÍRUS (%)		
	PLRV	PVX	PVY
BARAKA	2,3	0,03	14,06
CONTENDA	0,7	0,01	2,86
ELVIRA	3,6	0,40	10,86

4.5.8. CONSOLIDAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS

O objetivo principal deste trabalho foi o de pesquisar uma alternativa de origem de tecido vegetal que pudesse substituir as folhas, com a mesma eficiência e reduzindo o tempo para a detecção das viroses, em diferentes variedades de batata. Deste modo, sempre que foi encontrado que qualquer origem de tecido vegetal

poderia ser utilizada, optou-se pela indicação dos brotos, pois esta origem de material vegetal vem ao encontro aos objetivos propostos.

Na detecção do PLRV, conforme mostram as Tabelas 13, 14 e 15, os resultados das análises estatísticas indicam, para a variedade Baraka, os brotos como material vegetal possível de ser utilizado, enquanto que pela análise dos índices de igualdade e regularidade, as folhas são indicadas como a melhor origem. Esse resultado das médias estatisticamente superior quando da utilização da origem do tecido vegetal dos brotos em relação as médias encontradas do tecido vegetal das folhas, pode ser justificado pela diminuição na concentração do vírus (antígeno) após os testes sorológicos em tecidos da gema apical dormente + estolão e brotos (apical e lateral), principalmente tratando-se de vírus de baixa concentração. Isto propiciou que alguns dos tubérculos de batata-semente com diferentes quantidades de antígenos, associada as diferenças de desenvolvimento de cada planta, por ocasião da coleta das folhas aos 45 dias após a germinação, na diagnose do referido vírus, tivesse resultados negativos (falsos negativos), portanto, resultando em número de plantas positivas inferiores as encontradas nos brotos. Para a variedade Contenda, os brotos são indicados tanto pelas análises estatísticas quanto pela análise dos índices de regularidade e de igualdade. O resultado obtido para leitura visual, nesta variedade, que indicou a origem de tecido vegetal como sendo gemas apicais + estolão, foi devido à ocorrência de falsos positivos, ou seja, ao erro de interpretação quando da leitura visual, corrigido pela leitora de ELISA, conforme já relatado quando da apresentação dos resultados. Para a variedade Elvira, as análises indicaram brotos ou folhas como as melhores origens de tecido vegetal.

Para a detecção do PVX, segundo as Tabelas 13, 14 e 15, para a variedade

Baraka, os brotos foram os tecidos vegetais indicados a serem utilizados pelos resultados de todas as análises. Esta consistência de resultados pode ser devida ao fato de que, do ponto de vista prático, a incidência de PVX nas amostras foi extremamente baixa. Para a variedade Contenda, as análises estatísticas indicam os brotos como a origem de tecido vegetal a ser utilizada, enquanto que na análise dos índices de regularidade e igualdade a origem indicada foi a gema apical dormente + estolão. O motivo destes resultados foi idêntico aos encontrados na variedade Baraka, com incidências do PVX bastante baixa nas amostras. Para a variedade Elvira, as análises estatísticas e as dos índices de igualdade e regularidade indicaram os brotos e as folhas como as origens de tecido vegetal a serem utilizadas para a detecção do vírus X- PVX.

Para a detecção do vírus Y, de acordo como as Tabelas 13 à 15, para a variedade Baraka, a análise estatística indicou os brotos e as folhas como as origens de tecido vegetal a serem utilizadas, enquanto que a análise dos índices de igualdade e regularidade indicaram as folhas como a melhor origem de tecido vegetal. Para a variedade Contenda, os brotos e as folhas foram as origens de tecido vegetal indicadas pelas análises estatísticas e pelos índices de igualdade e regularidade. Para a variedade Elvira, a análise estatística indicou os brotos e as folhas como as melhores origens de tecido vegetal, enquanto que as análises dos índices de igualdade e regularidade indicaram os brotos como a melhor origem de tecido vegetal.

Tendo em vista os resultados obtidos nesta consolidação, os brotos nas condições em que foram realizados os experimentos, podem ser indicados como a origem de tecido vegetal a ser utilizada em substituição às folhas, visando a mesma eficiência que se obtêm quando do uso das folhas com a desejada redução do tempo

para a detecção das viroses.

Os resultados apresentados nas Tabelas 13 à 15 mostram que, do ponto de vista prático, não existem grandes diferenças entre a utilização dos brotos e das folhas na detecção dos três tipos de vírus, mesmo com a quebra de dormência natural dos tubérculos, para as três variedades estudadas.

Isto contraria os resultados obtidos por VETTEN **et al.** (1983), nos quais a detecção do PVY e PVA foram dificultadas e incertas em tubérculos com quebra de dormência natural, e, de FIGUEIRA **et al.** (1988), afirmando que a aplicação do teste sorológico ELISA para diagnose do PLRV, diretamente no broto emitido pelo tubérculo após quebra de dormência, propiciou alguns escapes, prejudicando o resultado final destes testes. Contraria também, o resultado obtido por SOUZA DIAS, **et al.** (1995), que afirma ser o teste de ELISA confiável para detecção do PLRV, com tecidos de gema do tubérculo-mãe, resultado semelhante somente encontrado em uma das variedades, não sendo confiável nos exames de rotina em laboratório onde o diagnóstico é feito visando 2 ou mais vírus e diferentes variedades para a certificação de sementes. Contraria, ainda, o trabalho de SPIELG e MARTIN (1993) na detecção do PLRV em tubérculos dormentes provenientes de campo e também em minitubérculos dormentes originários de cultivo “in vitro”, afirmando que o ELISA só foi eficiente na detecção do vírus nos minitubérculos.

TABELA 13 - SÍNTESE DOS RESULTADOS ESTATÍSTICOS DOS INDICES DE REGULARIDADE E IGUALDADE NA AVALIAÇÃO DAS ORIGENS DE TECIDO VEGETAL DA VARIEDADE BARAKA A SEREM RECOMENDADAS PARA A DETECÇÃO DE VÍRUS.

Nº DA TABELA OU GRÁFICO	ORIGEM DOS TECIDOS VEGETAIS	TIPO DE LEITURA	VÍRUS
ESTATÍSTICA – Tab 03	QUALQUER	VISUAL	PLRV , PVX
ESTATÍSTICA – Tab 03	BROTOS E FOLHAS	VISUAL	PVY
ESTATÍSTICA – Tab 04	BROTOS	ELISA	PLRV
ESTATÍSTICA – Tab 04	QUALQUER	ELISA	PVX
ESTATÍSTICA – Tab 04	BROTOS E FOLHAS	ELISA	PVY
REGULARIDADE - Tab 09	FOLHAS	AMBAS	PLRV
REGULARIDADE - Tab 09	QUALQUER	AMBAS	PVX
REGULARIDADE - Tab 09	FOLHAS	AMBAS	PVY
IGUALDADE – GRAFICO 01	FOLHAS	AMBAS	PLRV
IGUALDADE – GRAFICO 01	QUALQUER	AMBAS	PVX
IGUALDADE – GRAFICO 01	FOLHAS	AMBAS	PVY

TABELA 14- SÍNTESE DOS RESULTADOS ESTATÍSTICOS DOS INDICES DE REGULARIDADE E IGUALDADE NA AVALIAÇÃO DAS ORIGENS DE TECIDO VEGETAL DA VARIEDADE CONTENDA A SEREM RECOMENDADAS PARA A DETECÇÃO DE VÍRUS.

Nº DA TABELA OU GRÁFICO	ORIGEM DOS TECIDOS VEGETAIS	TIPO DE LEITURA	VÍRUS
ESTATÍSTICA – Tab 05	GEMA + ESTOLÃO	VISUAL	PLRV
ESTATÍSTICA – Tab 05	QUALQUER	VISUAL	PVX , PVY
ESTATÍSTICA – Tab 06	QUALQUER	ELISA	PLRV , PVX , PVY
REGULARIDADE - Tab 10	BROTOS	AMBAS	PLRV
REGULARIDADE - Tab 10	GEMA + ESTOLÃO	AMBAS	PVX
	BROTOS		
REGULARIDADE - Tab 10	FOLHAS	AMBAS	PVY
IGUALDADE – GRAFICO 02	BROTOS	AMBAS	PLRV
IGUALDADE – GRAFICO 02	GEMA + ESTOLÃO	AMBAS	PVX
IGUALDADE – GRAFICO 02	FOLHAS	AMBAS	PVY

TABELA 15 - SÍNTESE DOS RESULTADOS ESTATÍSTICOS DOS INDICES DE REGULARIDADE E IGUALDADE NA AVALIAÇÃO DAS ORIGENS DE TECIDO VEGETAL DA VARIEDADE ELVIRA A SEREM RECOMENDADAS PARA A DETECÇÃO DE VÍRUS.

Nº DA TABELA OU GRÁFICO	ORIGEM DOS TECIDOS VEGETAIS	TIPO DE LEITURA	VÍRUS
ESTATÍSTICA - Tab 07	QUALQUER	VISUAL	PLRV, PVX
ESTATÍSTICA - Tab 07	BROTOS, FOLHAS	VISUAL	PVY
ESTATÍSTICA - Tab 08	QUALQUER	ELISA	PLRV, PVX
ESTATÍSTICA - Tab 08	BROTOS, FOLHAS	ELISA	PVY
REGULARIDADE - Tab 11	FOLHAS	AMBAS	PLRV
REGULARIDADE - Tab 11	BROTOS, FOLHAS	AMBAS	PVX
REGULARIDADE - Tab 11	BROTOS	AMBAS	PVY
IGUALDADE - GRAFICO 03	FOLHAS	AMBAS	PLRV
IGUALDADE - GRAFICO 03	BROTOS, FOLHAS	AMBAS	PVX
IGUALDADE - GRAFICO 03	BROTOS	AMBAS	PVY

5. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

Tendo em vista os resultados apresentados pode-se concluir que:

- Os brotos são a origem de tecido vegetal que apresentou maior eficiência na detecção do PLRV, PVX e PVY, nas variedades de batata Baraka, Contenda e Elvira, como substituto das folhas no teste DAS-ELISA;
- Não há eficiência satisfatória na detecção do PVY, utilizando como origem de tecido vegetal gema apical dormente + estolão, para as três variedades testadas;
- A utilização de tecidos de brotos permitem que a detecção do PLRV, PVX e PVY seja feita de maneira precoce, em relação as folhas, com um ganho de no mínimo 30 dias, no tempo de detecção das viroses;
- Os níveis médios de incidência das diferentes viroses nas amostras oriundas de campos de batata-consumo, na segunda geração de multiplicação, para as variedades Baraka, Contenda e Elvira, foram maiores para o PVY e PLRV,

sendo que os do PVX foram muito baixos. A variedade Contenda foi a que apresentou os menores índices médios de incidência para os três vírus, quando comparados às demais variedades estudadas;

- O teste DAS-ELISA pode ser utilizado na detecção do PLRV e PVX em qualquer das origens de tecidos vegetais estudados, quais sejam, gema apical dormente + estolão, brotos com quebra de dormência natural e folhas da batata *S. tuberosum*, variedades Baraka, Contenda e Elvira;
- A eficiência do teste DAS-ELISA pode variar de acordo com origem do tecido vegetal utilizado;
- Entre as leituras visual e a leitora de ELISA, preferencialmente deve-se usar a leitura por meio da leitora de ELISA.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDRADE, E. R. Incidência de estirpes do vírus Y e degenerescência em seis cultivares de batata (*Solanum tuberosum* L.) no Sul de Minas. Lavras, Escola Superior de Agronomia de Lavras. **Dissertação de Mestrado**. 49 p. 1989.
2. ANDRADE, E. R.; FIGUEIRA, A. R. Incidência e sintomatologia de estirpes do vírus Y (PVY) nas regiões produtoras de batata do Sul de Minas Gerais. **Ciência e Prática**, [S.I.], n. 163, p. 371-376. 1992.
3. ÁVILA, A. C.; SALAZAR, L. F.; ORTEGA, M. e DANIELS, J. A. New strain of "Andean Potato Mottle Virus" from Brasil. **Plant Disease**, [S.I.], n. 68, p. 997-998. 1984.
4. ÁVILA, A. C. e BEEK, M. A. Principais viroses. In : REIFSCHNEIDER, F. J. B. (Ed.) **Produção de Batata**. Brasília – DF. Linha Gráfica e Editora. p. 103-117. 1987.
5. BEEMSTER, A. B. R.; DE BOKX, J. A. Survey of properties and symptoms. In : DE BOKX, J. A. ; VAN DER WANT, J. P. H. (Ed.). **Viruses of Potatoes and Seed potato Production**. 2ª ed. Wageningen: PUDOC, p. 84-113. 1987.
6. BETTI, J. A. Técnicas de detecção aplicadas no diagnóstico de vírus de plantas. Testes Biológicos usados no diagnóstico de Fitoviroses. **Summa Phytopathologica**. [S.I.], v. 21, n. 1, p. 72-76. 1995.
7. BRIOSO, P. S. T.; SANTIAGO, L. J. M.; BORGES, A. C. N.; FELIX, D. B. e OLIVEIRA, D. E. Molecular diagnosis of the susceptibility of different potato cultivars to the "Andean Potato Mottle Virus" strain C. **XXII Reunião da**

- Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular.**[S.I.], p. 77. 1993. (Abstract)
8. BRIOSO, P. S. T.; SOUZA DIAS, J. A. C. e OLIVEIRA, D. E. Detecção no Brasil, em tubérculo e folhas de batata infectadas através do teste de "Polymerase Chain Reaction (PCR). **Fitopatologia Brasileira**. [S.I.], v. 19 (Supl.), p. 322. Resumo 341. 1994.
 9. BRIOSO, P. S. T.; VICENTE A. C. P.; SHINDO, N. e OLIVEIRA, D. E. Amplification of "Andean Potato Mottle Vírus". **Summa Phytopathologica**. [S.I.], v. 21, n. 2, p.158-162. 1995.
 10. BRIOSO, P. S. T.; SOUZA DIAS, J. A. C.; COSTA, A. S. e OLIVEIRA, D. E. Detecção de vírus da batata em plantas infectadas e em afídeos virulíferos através de "Polymerase Chain Reaction" e de Dot-Blot". **Fitopatologia Brasileira**. [S.I.], v. 21, n. 3, p. 328-335. 1996.
 11. CASPER, R. Detection of potato leafroll vírus in potato and in *Physalis floridana* by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). **Phytopath. Z.**[S. I.], n. 90, p. 364-368. 1977.
 12. CATALAGO HOLANDÊS. **Catalogo Holandês de Variedades de Batata**. NIVAA, Den Haag. ISSN 0169-6661. CPRO-DLO, Wageningen. 264 p. 1994.
 13. CATALAGO HOLANDÊS. **Catalogo Holandês de Variedades de Batata**. NIVAA, Den Haag. ISSN 0169-6513. CPRO-DLO, Wageningen. 264 p. 1997.
 14. CATALOGO IAPAR, EMATER-PR e EMBRAPA/SPSB-CNPH. **Características da cultivar Contenda**. IAPAR- POLO DE CURITIBA. Curitiba-PR. Folders. 1995.
 15. CLARK, M. F.; ADAMS, A. N.; TRESH, I. M.; CASPER, R. The detection of plum pox and other viruses in woody plants by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) **Acta Hortic.**, [S. I.], n. 67, p. 51-57, 1976.
 16. CLARKE, R. G.; CONVERSE, R. H.; KOJIMA, M. Enzyme-linked immunosorbent assay to detect potato leafroll vírus in Potato tubers and viruliferous Aplieds. **Plant Disease**, [S. I.], v. 64, n.1, p. 43-45. 1980.
 17. COSTA, A. S.; KRUG, H. P. Moléstias de vírus da Batatinha em São Paulo. **Boletim do Instituto Agronômico de Campinas**, Campinas, n. 14, p. 55. 1937.

18. COSTA, A. S. e KIEHL, F. .Uma moléstia da batatinha “necrose do topo” causada pelo vírus do vira-cabeça. *Jornal de Agronomia (Piracicaba)*. v. 1, p. 193-202. 1938.
19. COSTA, A. S. Doenças de vírus do fumo, batata e tomateiro. Rio de Janeiro. **Boletim do Ministério da Agricultura**, Rio de Janeiro, 82 p. 1948.
20. COSTA, A. S.; CARVALHO, A. M. B. e DESLANDES, J. Ocorrência do vírus da necrose branca do fumo em plantações de batatinha. **Bragantia**. [S.l.], v. 23. p. I – VIII. 1964.
21. COSTA, A. S. Moléstias de Vírus da Batata: tudo sobre batata. **Boletim de Campo**, Rio de Janeiro, v. 190, p. 68-83. 1965.
22. COSTA LIMA, M. L. R. Z. Viroses da batata e suas implicações na produção da batata semente no estado do Paraná: histórico do problema e soluções. **Summa Phytopathologica**, [S. l.], v. 21, n. 34, p. 272. 1995.
23. COSTA, C. L. Variações sazonais da migração de *Myzus persicae* em Campinas nos anos de 1967-1969. **Bragantia**, [S. l.], v. 29, n. 32, p. 347-360. 1970.
24. CUPERTINO, F. P.; COSTA, A. S. Determinação do vírus do enrolamento em hastes velhas de batatal para sementes. **Bragantia**, [S.l.], v. 26, n. 13, p. 81-186. 1967.
25. CUPERTINO, F. P.; COSTA, A. S. Enrolamento apical da batata, sintoma da estação corrente do vírus do Enrolamento. **Revista da Sociedade Brasileira de Fitopatologia**, [S. l.], v. 2, n. 2, p. 75-80. 1968.
26. CUPERTINO, F. P. Avaliação das perdas causadas por vírus na produção da batata. I Enrolamento da Folha. **Bragantia**. [S.l.], v. 29, p. 337-346. 1970.
27. CUPERTINO, F. P. e COSTA, A. S. Avaliação das perdas causadas por vírus na produção de batata I. Vírus do enrolamento da folha. **Bragantia**. [S.l.], vol. 29, p. 337-345. 1970.
28. CUPERTINO, F. P.; COSTA, A. S.; LEITE, N. Influência da época e da localidade de plantio na disseminação do vírus do enrolamento da folha em batata para sementes. **Revista de Olericultura**, Campinas, n. 12, p. 57-59. 1972.

29. CUPERTINO, F. P.; Disseminação do vírus do Enrolamento da Folha em multiplicações sucessivas de batata-semente em São Paulo. **Tese de Doutorado**, ESALQ- USP, Piracicaba – SP. 59 p. 1972.
30. CUPERTINO, F. P.; BOTELHO, J. e COSTA, A. S. Avaliação das perdas causadas por vírus na produção de batata. II. Vírus A . **Bragantia**. [S.l.],v. 32, p. I – VIII. 1973.
31. DANIELS, J. Efeitos da infecção pelo vírus do enrolamento da folha da batata na produtividade das cultivares Baronesa e Santo Amor. EMBRAPA-UEPAE de Cascata, **Comunicado técnico**, Pelotas RS, n. 10, 6p. 1982.
32. DANIELS, J. Efeitos do forçamento de brotação, colheita antecipada e níveis populacionais de afídeos na produção e degenerescência da batata. **Fitopatologia Brasileira**. [S.l.], v. 8, p. 123-130. 1983.
33. DANIELS, J.; CARVALHO, T. C. e BISOGNIN, D. A. Um novo vírus latente da batata encontrado no Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**. [S.l.], v. 18 (Supl.), p. 287. 1993.
34. DANIELS, J. Viroses da batata e suas implicações na produção de batata-semente no Rio Grande do Sul. **Summa Phytopathologica**. [S.l.],v. 21, n. 34, p. 269-270. 1995.
35. DE BOKX, J. A.; PIRON, P. G. M. Effect of temperature on symptom expression and relative vírus concentration in potato plants infected with potato virus Y^N and Y^O. **Potato Research**, [S. l.], v. 20, n. 3, p. 207-213. 1977.
36. DE BOKX, J. A.; MAAT, D. Z. Detection of potato vírus Y^N in tubers with Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). **Med. Fac. Landbouw Rijksuniv. Gent.**, [S.l.], v. 44, n.2, p. 635-644. 1979.
37. DE BOKX, J. A.; PIRON, P.G.M.; MATT, D. Z. Detections of potato vírus X in tubers with the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). **Potato Research**, [S. l.], n. 23, p. 129-131. 1980.
38. DE BOKX, J. A.; CUPERUS, C.; PIRON, P. G. M. Elisa and “A 6” in Testing glasshouse grown plant for potato virus A (PVA). **Med. Fac. Landbouw Rijksuniv. Gent.**, [S.l.], v. 47, n. 3., p. 1017-1022. 1982a.

39. DE BOKX, J. A.; PIRON, P. G. M.; MATT, D. The detection of various strains of vírus Y by ELISA. **Med. Fac. Landbouw Rijksuniv. Gent.**, [S.l.], v. 47, n. 3, p. 1023-1028. 1982 b.
40. DE BOKX, J.A. Biological Properties. In : DE BOKX, J. A . e VAN DER WANT, J. P. H. (Ed.) **Viruses of potatoes and seed-potato production**. 2ª. ed. Wageningen : PUDOC, p. 58-82. 1987.
41. DUSI, A. N. e ÁVILA, A. C. Purificação e sorologia do vírus do Mosqueado Andino da batata (APMV), por ELISA direto e indireto. **Fitopatologia Brasileira**. [S.l.], v. 13, n. 4, p. 389-391. 1988.
42. DUSI, A. N.; THOMAS, P.E. e DUTRA, W. P. Anti-soro para detecção do vírus do enrolamento da folha da batata (PLRV): uma conquista da pesquisa. **Fitopatologia Brasileira**. [S.l.], n. 16, L. 1991. (Abstract)
43. EIRAS, M.; RESENDE, R. O. e ÁVILA, A. C. Detecção de vírus de plantas através de reação em cadeia da polimerase. **Summa Phytopathologica**. [S.l.], v. 23, n. 1, p. 5-17. 1998.
44. ELIAS, J. Algumas considerações sobre a degenerescência e produção de tubérculos semente de batatinha (*Solanum tuberosum* L.) **O Solo**, [S.l.], n. 47, p. 7-11. 1955.
45. FIGUEIRA, A. R.; RESENDE, R. O.; BOARI, A. J. Seed potato vírus indexation in Minas Gerais State. In: ENCONTRO NACIONAL DE VIROLOGIA (4. : 1988 : São Lourenço, MG). **Resumos do IV Encontro Nacional de Virologia**. São Lourenço – MG: [S.l.], 135 p., 1988.
46. FIGUEIRA, A. R.; A. C. PINTO. Estirpes necróticas do vírus Y da batata em sementes importadas esta causando problemas ao bataticultor mineiro. **Fitopatologia Brasileira**, [S.l.], n. 20, p. 299. 1995. (Suplemento)
47. FLEG, C. L.; CLARK, M. F. The detection of apple chlorotic leafroll vírus by a modified procedure of enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). **Ann. Appl. Biol.**, [S.l.], n. 91, p. 61-65. 1979.
48. FONSECA, M. E. N.; MARINHO, V. L. A.; BOITEAUX, L. S. e MONTENESHICH, D. C. Search for Beet Western Yellons Luteovirus in potatoes whith leaf roll disease. **Fitopatologia Brasileira**. [S.l.], v. 19, p. 290. 1994.

49. FUNDAÇÃO IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). **Anuário Estatístico do Brasil**. Rio de Janeiro. 1997.
50. GASPAR, J. O.; ESPINHA, L. M.; SOUZA, J. A. C.; LOPES, L. M. e BELINTANI, P. Imuno localização de fitovírus através da técnica de impressão de tecidos ("Tissue Printing"). **Fitopatologia Brasileira**. [S.l.], v. 19, p. 303. 1994.
51. GUGERLI, P. Potato vírus A and potato leafroll vírus purification, antiserum production and serological detection in potato and test plants by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Phytopath. Z.**, [S.l.], n. 96, p. 70 - 86. 1979.
52. HEUVEL, J. F. J. Van den; PETERS, D. Improves detection of potato leafroll vírus in Plant Material and in Aphids. **Phytopatology**, [S.l.], v. 79, n. 9, p. 963-967. 1989.
53. HOLBROOK, F. R. Transmission of potato leaf roll vírus by the green peach aphid. **Annals of Entomological Society of America**, [S.l.], v. 71, n. 6, p. 830-831. 1978.
54. HOWELL, P. J. The relationship between winter temperatures and the extent of potato leafroll vírus in seed potatoes in Scotland. **Potato Research**, [S.l.], v. 16, n. 1, p. 30-42. 1973.
55. IAPAR. Ensaios de cultivares conduzidos no Estado do Paraná pelo IAPAR durante os anos 1991 a 1995. **Dia de Campo = cultivares de batata**. Instituto Agrônomo do Paraná – IAPAR- Polo de Curitiba-PR. 5 p. 1995. (Resumo)
56. INOUE, N. S.; FIGUEIRA, A. R. Quebra de dormência em tubérculos de batata coletados em várias fases do ciclo. In : CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA ESAL (4. : 1989 : Lavras, MG). **Resumos e Programação ...**, Lavras, MG, ESAL, p. 109. 1989.
57. INOUE, N. S.; BOARI, A. J.; FIGUEIRA, A. R.; PINTO, A. C. dos S. Uso da técnica serológica ELISA associada aos testes de pré-cultura para indexação de batata-semente. In : CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA ESAL (4. : 1989: Lavras, MG). **Resumos e Programação...**, Lavras, MG, ESAL, p. 112. 1989.
58. LA PAPA em cifras. **CIP CIRCULAR**, Lima, v. 21, n. 3, p. 22. Dic. 1995.

59. LIMA, M. L. R. Z. C. e HAMERSCHMIDT, I., 1982. Avaliação da sanidade dos tubérculos-semente de batata utilizados em plantios de batata-consumo em dois Municípios do Estado do Paraná. **Summa Phytopathologica**. v. 7, p. 549. 1982.
60. LIMA, M. L. R. Z. C. Viroses da batata e suas implicações na produção de batata-semente no Estado do Paraná. Histórico e soluções. **Summa Phytopathologica**. [S.l.], v. 21, n. 3.4, p. 272-273. 1995.
61. MAAT, D. Z.; DE BOKX, J. A. Potato leafroll vírus: antiserum preparation and detection in potato leaves and Sprouts with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Neth J. Pl. Pathology**, [S.l.], v. 84, p. 149-156. 1978.
62. MALLOZZI, P. Testes virológicos para a batata-semente importada. **O Biológico**, São Paulo- SP, v. 40, n. 07, p. 205-208. 1974.
63. MALLOZZI, P. R. Sintomatologia e técnicas de laboratório na identificação de vírus. In: **Tecnologia de produção de batata-semente**. Brasília: AGIPLAN-MA, p. 119-124. 1976.
64. MALLOZZI, P. R. Disseminação e controle das viroses. Batata. **Correio Agrícola Bayer**, [S.l.], v. 3, n. 82, p. 464-465. 1982. (Ed. Especial) 63. MALLOZZI, P.R. Sintomas do vírus do Rattle veiculados pela batata-semente Importada. *Fitopatologia Brasileira*. [S.l.], v. 9, p. 403. 1984.
65. MALLOZZI, P. R. Produção e Controle de Qualidade da Batata-Semente por meio de Pré – Cultura. São Paulo: **Instituto Biológico de São Paulo**. 9 p. 1986. (Resumo)
66. MARCO, S. Incidence of potato vírus Y and potato leafroll vírus in autumn potatoes in Israel. **Potato Research**, [S.l.], v. 24, n. 3, p. 353-356. 1981.
67. MC DONALD, M. S. Effects of leafroll vírus infection on the development of tubers in the potato plant. **Potato Research**, [S.l.], v.19, n. 4, p. 349-355. 1976.
68. MC DONALD, J. G.; SINGH, R. P. Assessment of north American isolates of PVY^N for strains that induce tuber ring necrosis disease. **American Potato Journal**, [S.l.], n. 70, p. 827. 1993.

69. MORIMOTO, F. Dados sobre as produções mundiais, brasileira e paranaense de olerícolas e suas produtividades. Curitiba : COOPER EMATER PARANÁ, (Boletim Pós-Colheita. n. 13, 1ª Quinzena de março) 14 p. 1996.
70. PARANÁ. Secretaria de Estado da Agricultura e Abastecimento. Normas, padrões e procedimentos para certificação de batata-semente no Estado do Paraná. Curitiba. 1981.
71. PETERS, D. Spread of viruses in potato crops. In : DE BOKX, J. A.; VAN DER WANT, J. H. P.. (Ed). **Viruses of potatoes and seed potato Production**. 2ª ed. Wageningen : PUDOC. p. 126-145. 1987.
72. PIO-RIBEIRO, G.; PAZ, C. D.; ASSIS FILHO, F. M. e PIRES, C. R. C. Detecção sorológica de vírus em uma coleção de batata (*Solanum tuberosum*) no Estado de Pernambuco. **Fitopatologia Brasileira**. [S.l.], v. 19, p. 473-475. 1994.
73. PUTTEMANS, A. Informações sobre “doenças de degenerescência” da batateira no Brasil. **Revista da Agricultura**, [S.l.], v. 9, n. ¾, p. 103-111. 1934.
74. REGINA, S. M. Política Nacional para a batata-semente. **Correio Agrícola Bayer**, [S.l.], n. 3, p. 434-435. 1982.
75. RESENDE, R. O. Técnicas moleculares para detecção de vírus de plantas. **Fitopatologia Brasileira**. [S.l.], v. 21, n. 1, p. 77-78. 1995.
76. ROBERTS, I. M.; HARRISON, B. D. Detection of potato leafroll and potato mop-top viruses by immunosorbent electron microscopy. **Annals of Applied Biology**, [S.l.], n. 93, p. 289- 297. 1979.
77. SALAZAR, L. F. Aplicación de la técnica serológica com conjugados enzimáticos (ELIZA) para diagnosticar vírus de la papa. **Fitopatologia**, [S.l.], n. 14, p. 1-9. 1979.
78. SALAZAR, L. F. **Guia II/3 - Detección com ELISA (Enzyme-linked immunosobent assay) de vírus de papa**. Lima: Centro Internacional de La Papa, Depto. de Capacitacion Y Comunicaciones, 1993. 12 p. (Série II : Métodos de Detection de Virus y viroides).
79. SALAZAR, L. F. **Los vírus de la Papa y su control**. Lima: Centro Internacional de La Papa, 1995. 226 p.

80. SCHULTZ, E. S.; FOLSON, D. Leafroll, net-necrosis and sprouting-sprout of the irish potato. **Jour. Agr. Research** [S.I.], v. 21, n. 1, p. 47-80. 1921.
81. SCHULTS, E. S.; FOLSON, D. Transmission variation and control of certain degeneration diseases of irish potatoes. **Jour. Agr. Res.**, [S.I.], v.25, n. 2, p. 43-117. 1923.
82. SEAB-DERAL. Evolução de área, produção, rendimento, percentuais de produção e colocação Paraná/Brasil do produto batata. **CEPAGRO, AGO**. Curitiba. 1995.
83. SEAB/DEFIS-DPSM. **Dados de Produção de Sementes Safra 96/97**. Comissão Estadual de Sementes e Mudas- PR. Curitiba. Março de 1999.
84. SELF, C. H. Enzyme amplification – A general method applied to provide in immunoassisted assay for placental alkaline phosphatase. **J. Immunol. Methods**, [S.I.], n. 76, p. 383-389. 1985.
85. SILBERSCHMIDT, K. M. A degenerescência da batatinha. **O Biológico**. São Paulo - SP, v. 3, n. 9, p. 247-254. 1937.
86. SILBERSCHMIDT, K. M.; NOBREGA N. R. e KRAMER, M. Sobre a variante do vírus X das batatinhas no Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**. São Paulo. v. 12, p. 27-58. 1941.
87. SILBERSCHMIDT, K. M.; KRAMER, M. O vírus Y, uma das principais causas da degenerescência da batatinha no estado de São Paulo. **O Biológico**, São Paulo-SP, v. 8, n. 2, p. 39-46. 1942.
88. SILBERSCHMIDT, K.M. The effect of premunity on the type of lesions induced by Aucuba Mosaic Virus. *Tidschr. Planterziekten*. [S.I.], v. 55, p. 166-178. 1949.
89. SILBERSCHMIDT, K.M.; MALLOZZI, P. R. The interaction of potato viruses X and Y in its significance for potato degeneration. **Proc. 10 th Int. Botanical Congress**. [S.I.], p. 470-471. 1961. (Abstract)
90. SINGH, R. P.; MC DONALD, J. G. Purification of potato virus Y and its detection in potato by Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Ann. Pot. Jour.**, [S.I.], n. 58, p. 181-189. 1981.

91. SINGH, R. P., 1983. Effect of storage temperatures on Potato virus infectivity levels and serological detection by enzyme linked immunosorbent assay. **Plant Disease**, [S.l.], v. 67, n. 10, p. 1133-1136. 1983.
92. SIQUEIRA, O. Indexação e formação de estoque básico de batata-semente. **Revista da Sociedade Brasileira de Fitopatologia**, [S.l.], v. 2, n. 2, p. 100-113. 1968.
93. SIQUEIRA, O. Principais virose da batata no Brasil. In : AGIPLAN, **Tecnologia e Produção de Batata-Semente**. Brasília: Ministério da Agricultura, p. 97-118. 1976.
94. SOUZA DIAS, J. A. C.; VEJA, J.; MALLOZZI, P. R.; MIRANDA FILHO, H. S.; TEXEIRA, P. R. M. e COSTA, A. S.. Ocorrência de infecção natural de batata por vírus do grupo do anel do pimentão em São Paulo. **Summa Phytopathologica**. [S.l.], v.5, p. 21. 1979.
95. SOUZA DIAS, J. A. C.; COSTA, A. S. e YUKI, V. A.Ocorrência do Mosaico Amarelo (Calico) da batata numa plantação em Minas Gerais. **Summa Phytopathologica**. [S.l.], v. 8, p. 45-47. 1982.
96. SOUZA DIAS, J. A. C.; MIRANDA, F. H. S.; RAMOS, J. J.; COSTA, A. S. Redução na produção da batata induzida pela infecção da estação corrente com o vírus do enrolamento da folha. **Summa Phytopathologica**, [S.l.], v. 9, n. 1/2, p. 78-79. 1983.
97. SOUZA DIAS, J. A.C.; COSTA, A. S.; RAMOS, V. J. Enrolamento da folha é também praticamente, o único fator de degenerescência da batata-semente no período 1980-84 na estação experimental de Itararé-SP. **Fitopatologia Brasileira**, [S.l.], v. 9, n. 2, p. 405. 1984a.
98. SOUZA DIAS, J. A. C.; MIRANDA, F. H. S.; RAMOS, V. J. A. S.; IGUE, T. Produção de batata-semente Araci com diferentes níveis de enrolamento. **Fitopatologia Brasileira**, [S.l.], n. 9, n. 2, p. 203-211. 1984 b.
99. SOUZA DIAS, J. A. C.; COSTA, A. S.; ASANO, E. M. Elevada incidência (80%) de sintomas semelhantes ao enrolamento secundário em infecção primária de batatal de semente importada. **Summa Phytopathologica**, [S.l.], v. 11, n. 1/2, p. 55-56. 1985.

100. SOUZA DIAS, J. A. C.; AMANCIO, A. V.; COSTA, A. S. O vírus do enrolamento da folha da batata continua a ser a principal causa da degenerescência da batata-semente no Estado de São Paulo. **Fitopatologia Brasileira**, [S.l.], v. 15, n. 2, p. 136. 1990.
101. SOUZA DIAS, J. A. C.; SCAGLIUSI, S. M.; AMANCIO, A.V.; MIRANDA Fº, H. S.; COSTA, A. S. Batata-semente certificada da Argentina encontra-se dentro dos padrões brasileiros de sanidade a vírus, mas a presença dos vírus Y^N e do mosaico da alfafa suscita preocupações. **Summa Phytopathologica**, [S.l.], n. 18, p. 35. 1992.
102. SOUZA DIAS, J. A. C.; COSTA A. S. ELISA de tubérculos para uma rápida avaliação da infecção primária do vírus do enrolamento da folha da batata. **Summa Phytopathologica**. [S.l.], vol. 18, p. 36. 1992.
103. SOUZA DIAS, J. A. C.; COSTA, A. S. e NARDIN, A. M. Potato Leafroll Vírus in Solanaceous needs in Brasil explains sevre outbreakers of the disease in absence of Know potato clonos sources. **Summa Phytopathologica**. [S.l.], vol. 19, p. 80-85. 1993.
104. SOUZA DIAS, J. A. C.; COSTA, A. S.; TRISTÃO, J. F. Teste ELISA com tecidos de gema do tubérculo-mãe para o vírus do enrolamento da folha da batata (PLRV) é confiável e pode esclarecer a origem do vírus nas dependências ou caso de seguro. **Summa Phytopathologica**. In : CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLÓGIA (1995 : Piracicaba). Piracicaba : ESALQ : USP, 1995 a. (Resumo 19).
105. SOUZA DIAS, J. A. C.; TRISTÃO, J. F.; MIRANDA, F. H. S. Vírus Y na batata-semente cv. Atlantic: alteração na epidemiologia da virose em São Paulo e Paraná. **Fitopatologia Brasileira**. [S.l.], v. 20, (Suplemento : 320). 1995b.
106. SOUZA DIAS, J. A. C. Viroses da batata e suas implicações na produção de batata-semente no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, [S.l.], v. 21, n. 34, p.264-266. 1995.
107. SOUZA DIAS, J. A. C.; RUSSO, P.; BETTI, J. A.; MILLER, L.; SLACK, S. A. A Simplifield Extractcion Method for ELISA and PCR Detection of Primary Potato Leafroll Virus(PLRV) Infection in Dormant Potato Tubers. **American Potato Journal**, [S.l.], n. 74, p. 468-469. 1997.

108. SPIEGEL, S. e MARTIN, R. R. Improved detection of leafroll vírus in dormant potato tubers and microtubers by the polymerase chain reaction and ELISA. **Annals of Applied Biology**, [S.l.], v. 122, n. 3, p. 493-500. 1993.
109. TAKANAMI, Y.; KUBO, S. Enzyme assisted purification of two phoem limited plant viruses; tobacco necrotic dwarf and potato leafroll. **J. Gen. Virol.**, [S.l.], n. 44, p. 153-159.1979.
110. TAMADA, T.; HARRISON B. D. Aplication of potato vírus Y and A in tubers in enzyme-linked immunosorbent assay after natural breack of dormancy. **Phytopathologische Zeitschrift**. [S.l.], v. 108, p. 4-53.1980.
111. TOKESHI, A. e BERGAMIN, F. A. Doenças da batata. In: GALLI, F., Coord. **Manual de Fitopatologia**, São Paulo: Ceres, 1980. v. 2, p. 102-120.
112. VAN VUURDE, J. W. L. e MAAT, D. Z. Enzyme-linked immunosorbent assy (ELISA) and disperse-dye immuno assay (DIA) : comparasion of simultaneous and separate incubation of sample and conjugate for the routine detection of lettuce mosaic virus and pea early-browning virus in seeds. **Neth J. Plant. Pathol.** [S.l.], n. 91, p. 3-13. 1985.
113. VEGA, J.; SOUZA DIAS, J. A. C.; COSTA, A. S. Correlação entre severidade dos sintomas e concentração do vírus do enrolamento da batata nem sempre é verdadeira. **Fitopatologia Brasileira**, [S.l.], v. 15, n. 2, p. 133. 1990.
114. VEGA, J.; WINTER, S.; PURAC, A. e HAMILTON, R. I. Partial characterization of a whitefly-transmitted geminivirus from potato in Brasil. **Fitopatologia Brasileira**. [S.l.], v. 17, p. 167. 1992. (Abstract)
115. VETTEN, H. J.; EHLERS, U.; PAUL, H. L. Detection of potato viruses Y and in tubers by enzyme-linked immunosorbent assay after natural and artificial break of dormancy. **Phytopath. Z.**, [S.l.], n. 108, p. 41-53. 1983.
116. VOLER, A.; BARTLETT, A.; BIDWELL, D.; CLARK. F. e ADAMS, A. N. The detection of viruses by enzyme linked immunosorbent assay. **Journal of General Biology**, [S.l.], n. 33 : 165-167. 1976.
117. YUKI, V. A. Afídeos vetores de vírus da batata. **Correio Agrícola Bayer**, São Paulo, n. 3, p. 460-463. 1982.

7. APENDICE

APÊNDICE I. MAPEAMENTO DE DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS NAS
MICROPLACAS
SOROLOGIA/ TESTE DAS - ELISA

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	9	17	25	33	41	49	57	65	73	81	89
B	2	10	18	26	34	42	50	58	66	74	82	90
C	3	11	19	27	35	43	51	59	67	75	83	91
D	4	12	20	28	36	44	52	60	68	76	84	92
E	5	13	21	29	37	45	53	61	69	77	85	93
F	6	14	22	30	38	46	54	62	70	78	86	94
G	7	15	23	31	39	47	55	63	71	79	87	95
H	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88	96

Variedades: **ELVIRA**,
BARAKA E CONTENDA
Placa N° : 01-E-PVX
GEMA E ESTOLÃO,
BROTOS E FOLHAS.

1: 01 BLK	5:	PVX II... 33 E II 05	9:	PVX III.. 65 E III 09
 02 BLK	 34 E II 06	 66 E III 10
 03 BLK	 35 E II 07	 67 E III 11
 04 BLK	 36 E II 08	 68 E III 12
 05 BLK	 37 E II 09	 69 E III 13
 06 BLK	 38 E II 10	 70 E III 14
 07 BLK	 39 E II 11	 71 E III 15
 08 BLK	 40 E II 12	 72 E III 16
2:	PVX I.. 09 E I 01	6: 41 E II 13	10: 73 E III 17
 10 E I 02	 42 E II 14	 74 E III 18
 11 E I 03	 43 E II 15	 75 E III 19
 12 E I 04	 44 E II 16	 76 E III 20
 13 E I 05	 45 E II 17		PVX IV.. 77 E IV 01
 14 E I 06	 46 E II 18	 78 E IV 02
 15 E I 07	 47 E II 19	 79 E IV 03
 16 E I 08	 48 E II 20	 80 E IV 04
3: 17 E I 09	7:	CONT... 49 BLK	11: 81 E IV 05
 18 E I 10	 50 POS.	 82 E IV 06
 19 E I 11	 51 POS.	 83 E IV 07
 20 E I 12	 52 BLK	 84 E IV 08
 21 E I 13	 53 NEG.	 85 E IV 09
 22 E I 14	 54 NEG.	 86 E IV 10
 23 E I 15	 55 BLK	 87 E IV 11
 24 E I 16	 56 BLK	 88 E IV 12
4: 25 E I 17	8:	PVX III.. 57 E III 01	12: 89 E IV 13
 26 E I 18	 58 E III 02	 90 E IV 14
 27 E I 19	 59 E III 03	 91 E IV 15
 28 E I 20	 60 E III 04	 92 E IV 16
	PVX II.. 29 E II 01	 61 E III 05	 93 E IV 17
 30 E II 02	 62 E III 06	 94 E IV 18
 31 E II 03	 63 E III 07	 95 E IV 19
 32 E II 04	 64 E III 08	 96 E IV 20

APÊNDICE II . MAPEAMENTO DE DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS NAS
MICROPLACAS
SOROLOGIA/ TESTE DAS - ELISA

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	9	17	25	33	41	49	57	65	73	81	89
B	2	10	18	26	34	42	50	58	66	74	82	90
C	3	11	19	27	35	43	51	59	67	75	83	91
D	4	12	20	28	36	44	52	60	68	76	84	92
E	5	13	21	29	37	45	53	61	69	77	85	93
F	6	14	22	30	38	46	54	62	70	78	86	94
G	7	15	23	31	39	47	55	63	71	79	87	95
H	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88	96

Variedade: **ELVIRA**,
BARAKA E CONTENDA.
Placa Nº : 02-E-PVY
GEMA E ESTOLÃO,
BROTOS E FOLHAS.

1: 01 BLK	PVY II... 33 E II 05	PVY III.. 65 E III 09
 02 BLK 34 E II 06 66 E III 10
 03 BLK 35 E II 07 67 E III 11
 04 BLK	5: 36 E II 08	9: 68 E III 12
 05 BLK 37 E II 09 69 E III 13
 06 BLK 38 E II 10 70 E III 14
 07 BLK 39 E II 11 71 E III 15
 08 BLK 40 E II 12 72 E III 16
2:	PVY I.. 09 E I 01 41 E II 13 73 E III 17
 10 E I 02 42 E II 14 74 E III 18
 11 E I 03 43 E II 15 75 E III 19
 12 E I 04	6: 44 E II 16	10: 76 E III 20
 13 E I 05 45 E II 17	PVY IV.. 77 E IV 01
 14 E I 06 46 E II 18 78 E IV 02
 15 E I 07 47 E II 19 79 E IV 03
 16 E I 08 48 E II 20 80 E IV 04
3: 17 E I 09	CONT... 49 BLK 81 E IV 05
 18 E I 10 50 POS. 82 E IV 06
 19 E I 11 51 POS. 83 E IV 07
 20 E I 12	7: 52 BLK	11: 84 E IV 08
 21 E I 13 53 NEG. 85 E IV 09
 22 E I 14 54 NEG. 86 E IV 10
 23 E I 15 55 BLK 87 E IV 11
 24 E I 16 56 BLK 88 E IV 12
4: 25 E I 17	PVY III.. 57 E III 01 89 E IV 13
 26 E I 18 58 E III 02 90 E IV 14
 27 E I 19 59 E III 03 91 E IV 15
 28 E I 20	8: 60 E III 04	12: 92 E IV 16
	PVY II.. 29 E II 01 61 E III 05 93 E IV 17
 30 E II 02 62 E III 06 94 E IV 18
 31 E II 03 63 E III 07 95 E IV 19
 32 E II 04 64 E III 08 96 E IV 20

**APÊNDICE III . MAPEAMENTO DE DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS NAS
MICROPLACAS
SOROLOGIA/ TESTE DAS - ELISA**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	9	17	25	33	41	49	57	65	73	81	89
B	2	10	18	26	34	42	50	58	66	74	82	90
C	3	11	19	27	35	43	51	59	67	75	83	91
D	4	12	20	28	36	44	52	60	68	76	84	92
E	5	13	21	29	37	45	53	61	69	77	85	93
F	6	14	22	30	38	46	54	62	70	78	86	94
G	7	15	23	31	39	47	55	63	71	79	87	95
H	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88	96

Variedade: **ELVIRA**,
BARAKA E CONTENDA.
Placa Nº : 03-E-PLRV
GEMA E ESTOLÃO,
BROTOS E FOLHAS.

1: 01 BLK	PLRV II... 33 E II 05	PLRV III... 65 E III 09
 02 BLK 34 E II 06 66 E III 10
 03 BLK 35 E II 07 67 E III 11
 04 BLK	5: 36 E II 08	9: 68 E III 12
 05 BLK 37 E II 09 69 E III 13
 06 BLK 38 E II 10 70 E III 14
 07 BLK 39 E II 11 71 E III 15
 08 BLK 40 E II 12 72 E III 16
2:	PLRV I... 09 E I 01 41 E II 13 73 E III 17
 10 E I 02 42 E II 14 74 E III 18
 11 E I 03 43 E II 15 75 E III 19
 12 E I 04	6: 44 E II 16	10: 76 E III 20
 13 E I 05 45 E II 17	PLRV IV... 77 E IV 01
 14 E I 06 46 E II 18 78 E IV 02
 15 E I 07 47 E II 19 79 E IV 03
 16 E I 08 48 E II 20 80 E IV 04
3: 17 E I 09	CONT..... 49 BLK 81 E IV 05
 18 E I 10 50 POS. 82 E IV 06
 19 E I 11 51 POS. 83 E IV 07
 20 E I 12	7: 52 BLK	11: 84 E IV 08
 21 E I 13 53 NEG. 85 E IV 09
 22 E I 14 54 NEG. 86 E IV 10
 23 E I 15 55 BLK 87 E IV 11
 24 E I 16 56 BLK 88 E IV 12
4: 25 E I 17	PLRV III... 57 E III 01 89 E IV 13
 26 E I 18 58 E III 02 90 E IV 14
 27 E I 19 59 E III 03 91 E IV 15
 28 E I 20	8: 60 E III 04	12: 92 E IV 16
	PLRV II... 29 E II 01 61 E III 05 93 E IV 17
 30 E II 02 62 E III 06 94 E IV 18
 31 E II 03 63 E III 07 95 E IV 19
 32 E II 04 64 E III 08 96 E IV 20

**APÊNDICE IV . MAPEAMENTO DE DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS NAS
MICROPLACAS
SOROLOGIA/ TESTE DAS - ELISA**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	9	17	25	33	41	49	57	65	73	81	89
B	2	10	18	26	34	42	50	58	66	74	82	90
C	3	11	19	27	35	43	51	59	67	75	83	91
D	4	12	20	28	36	44	52	60	68	76	84	92
E	5	13	21	29	37	45	53	61	69	77	85	93
F	6	14	22	30	38	46	54	62	70	78	86	94
G	7	15	23	31	39	47	55	63	71	79	87	95
H	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88	96

Variedade: **ELVIRA**,
BARAKA E CONTENDA.
**Placa N° : 04-E-PVX, PVY
E PLRV**
GEMA E ESTOLÃO
BROTOS E FOLHAS.

1: 01 BLK	CONT..... 33 BLK	CONT..... 65 BLK
 02 BLK 34 POS.X 66 POS.X
 03 BLK 35 NEG.X 67 NEG.X
 04 BLK	5: 36 POS.Y	9: 68 POS.Y
 05 BLK 37 NEG.Y 69 NEG.Y
 06 BLK 38 POS.RV 70 POS.RV
 07 BLK 39 NEG.RV 71 NEG.RV
 08 BLK 40 BLK 72 BLK
2:	PVX V... 09 E V 01	PVY V.... 41 E V 01	PLRV V.. 73 E V 01
 10 E V 02 42 E V 02 74 E V 02
 11 E V 03 43 E V 03 75 E V 03
 12 E V 04	6: 44 E V 04	10: 76 E V 04
 13 E V 05 45 E V 05 77 E V 05
 14 E V 06 46 E V 06 78 E V 06
 15 E V 07 47 E V 07 79 E V 07
 16 E V 08 48 E V 08 80 E IV 08
3: 17 E V 09 49 E V 09 81 E IV 09
 18 E V 10 50 E V 10 82 E IV 10
 19 E V 11 51 E V 11 83 E IV 11
 20 E V 12	7: 52 E V 12	11: 84 E IV 12
 21 E V 13 53 E V 13 85 E IV 13
 22 E V 14 54 E V 14 86 E IV 14
 23 E V 15 55 E V 15 87 E IV 15
 24 E V 16 56 E V 16 88 E IV 16
4: 25 E V 17 57 E V 17 89 E V 17
 26 E V 18 58 E V 18 90 E V 18
 27 E V 19 59 E V 19 91 E V 19
 28 E V 20	8: 60 E V 20	12: 92 E V 20
 29 BLK 61 BLK 93 BLK
 30 BLK 62 BLK 94 BLK
 31 BLK 63 BLK 95 BLK
 32 BLK 64 BLK 96 BLK

APÊNDICE V . RESULTADOS DO NÚMERO DE VALORES NEGATIVOS E POSITIVOS OBTIDOS NO TESTE DAS-ELISA PELA LEITORA DE ELISA E LEITURA VISUAL. NAS DIFERENTES ORIGENS DOS TECIDOS VEGETAIS, PARA A VARIEDADE BARAKA.

VÍRUS	REPETIÇÃO	ORIGEM DOS TECIDOS VEGETAIS					
		G.A + ESTOLÃO		BROTOS		FOLHAS	
		-	+	-	+	-	+
PLRV	I	19(19)	01(01)	11(17)	09(03)	16(14)	04(06)
	II	20(20)	00(00)	15(20)	05(02)	17(17)	03(03)
	III	20(17)	00(03)	16(19)	04(02)	18(18)	02(02)
	IV	20(19)	00(01)	15(18)	05(02)	19(19)	01(01)
	V	20(20)	00(00)	15(19)	05(01)	17(17)	03(03)
PVX	I	20(20)	00(00)	20(20)	00(00)	20(20)	00(00)
	II	20(20)	00(00)	20(20)	00(00)	20(20)	00(00)
	III	19(19)	01(01)	20(20)	00(00)	20(20)	00(00)
	IV	20(20)	00(00)	20(20)	00(00)	20(20)	00(00)
	V	20(20)	00(00)	20(20)	00(00)	20(20)	00(00)
PVY	I	10(09)	10(11)	08(10)	12(10)	08(08)	12(12)
	II	10(10)	10(10)	03(06)	17(14)	03(03)	17(17)
	III	07(07)	13(13)	02(02)	18(18)	03(03)	17(17)
	IV	06(08)	14(12)	01(01)	19(19)	06(06)	14(14)
	V	12(12)	08(08)	04(04)	16(16)	03(03)	17(17)

APÊNDICE VI . RESULTADOS DO NÚMERO DE VALORES NEGATIVOS E POSITIVOS OBTIDOS NO TESTE DAS-ELISA PELA LEITORA DE ELISA E LEITURA VISUAL, NAS DIFERENTES ORIGENS DOS TECIDOS VEGETAIS, PARA A VARIEDADE CONTENDA.

VÍRUS	REPETIÇÃO	ORIGEM DOS TECIDOS VEGETAIS					
		G.A + ESTOLÃO		BROTOS		FOLHAS	
		-	+	-	+	-	+
PLRV	I	20(02)	00(18)	20(20)	00(00)	20(20)	00(00)
	II	20(01)	00(19)	20(20)	00(00)	19(19)	01(01)
	III	20(01)	00(19)	20(20)	00(00)	17(17)	03(03)
	IV	20(01)	00(19)	20(20)	00(00)	18(18)	02(02)
	V	20(20)	00(00)	20(20)	00(00)	14(17)	06(03)
PVX	I	20(20)	00(00)	20(20)	00(00)	20(20)	00(00)
	II	20(20)	00(00)	20(20)	00(00)	20(20)	00(00)
	III	20(20)	00(00)	20(19)	00(01)	20(20)	00(00)
	IV	20(20)	00(00)	20(20)	00(00)	20(20)	00(00)
	V	20(20)	00(00)	20(20)	00(00)	18(20)	02(00)
PVY	I	20(18)	00(02)	17(17)	03(03)	17(17)	03(03)
	II	19(17)	01(03)	16(16)	04(04)	16(16)	04(04)
	III	20(17)	00(03)	15(11)	05(09)	17(17)	03(03)
	IV	20(17)	00(03)	16(16)	04(04)	15(15)	05(05)
	V	20(20)	00(00)	18(18)	02(02)	18(18)	02(02)

APÊNDICE VII . RESULTADOS DO NÚMERO DE VALORES NEGATIVOS E POSITIVOS OBTIDOS NO TESTE DAS-ELISA PELA LEITORA DE ELISA E LEITURA VISUAL, NAS DIFERENTES ORIGENS DOS TECIDOS VEGETAIS, PARA A VARIEDADE ELVIRA.

VÍRUS	REPETIÇÃO	ORIGEM DOS TECIDOS VEGETAIS					
		G.A + ESTOLÃO		BROTOS		FOLHAS	
		-	+	-	+	-	+
PLRV	I	20(17)	00(03)	18(18)	02(02)	18(18)	02(02)
	II	20(20)	00(00)	17(18)	03(03)	18(18)	02(02)
	III	20(20)	00(00)	17(17)	03(03)	16(16)	03(03) ¹
	IV	20(20)	00(00)	17(17)	03(03)	15(15)	04(04) ²
	V	01(01)	19(19)	20(15)	00(05)	15(15)	03(03) ³
PVX	I	20(20)	00(00)	20(20)	00(00)	20(20)	00(00)
	II	20(20)	00(00)	20(20)	00(00)	20(20)	00(00)
	III	20(20)	00(00)	20(20)	00(00)	19(19)	00(00) ¹
	IV	20(16)	00(04)	20(20)	00(00)	19(19)	00(00) ²
	V	20(20)	00(00)	20(20)	00(00)	18(18)	00(00) ³
PVY	I	20(17)	00(03)	05(05)	15(15)	05(05)	15(15)
	II	20(20)	00(00)	04(04)	16(16)	04(04)	16(16)
	III	17(14)	03(06)	05(05)	15(15)	04(04)	15(15) ¹
	IV	20(12)	00(08)	06(06)	14(14)	05(04)	14(15) ²
	V	16(17)	04(03)	08(08)	12(12)	06(05)	12(13) ³

(¹) Tubérculo sem germinação – *Erwinia* spp. = 01 Negativo

(²) Tubérculo sem germinação – *Erwinia* spp. = 01 Positivo

(³) Tubérculo sem germinação – *Erwinia* spp. = 02 Positivo

APÊNDICE VIII. COMPOSIÇÃO DOS TAMPÕES DAS QUATRO ETAPAS E LAVAGENS DAS MICROPLACAS DO TESTE DAS-ELISA.

1. TAMPÃO DE CARBONATO OU ADSORÇÃO PARA DILUIÇÃO DO ANTICORPO		
Água Destilada	ml	1000 (pH = 4 a 6)
Na ₂ CO ₃	Gramas	1,59
NaHCO ₃	Gramas	2,93
Conservar em geladeira 1 a 2 semanas.		pH = 9,6
2- TAMPÃO DE DILUIÇÃO DO IgG CONJUGADO E SUCO RESULTADO DA EXTRAÇÃO DAS ORIGENS DE MATERIAL VEGETAL (GEMAS APICAL + ESTOLÃO, BROTO E FOLHAS) ANTIGENOS.		
PBS-TWEEN – 20	ml	1000
PVP-40 (2%)	Gramas	20
ALBUMINA DE OVO(1%)	Gramas	10
Conservar em geladeira 1 a 2 semanas.		pH = 7,4
3- TAMPÃO DE DILUIÇÃO DO SUBSTRATO		
Água Destilada	ml	800 (pH = 4 a 6)
Dietalonamina	ml	97
Regular o pH com HCl;		pH = 9,8
Completar com água destilada até atingir 1000 ml da solução;		
Conservar em geladeira até 01 mês.		
4- TAMPÃO PBS-TWEEN-20 PARA LAVAGEM E TAMPÃO DE DILUIÇÃO (2).		
Água Destilada	ml	1000 (pH = 4 a 6)
NaCl	Gramas	8,0
Na ₂ HPO ₄ . 12 H ₂ O	Gramas	2,9
KH ₂ PO ₄	Gramas	0,2
KCl	Gramas	0,2
Quantidade superior a 01 litro preparar sem o TWEEN-20, conservando em geladeira por meses.		
TWEEN-20	ml	0,5
Colocando o TWEEN-20 conservar em geladeira 1 a 2 semanas.		